



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DEL
CYP-450 EMPLEANDO HIDRURO DE SILICIO
COMO DONADOR DE ELECTRONES

T É S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A

SANDRA SELENE ORTIZ PÉREZ

ASESORES: DRA. MARTHA CECILIA ROSALES HERNÁNDEZ
DR. JUAN MANUEL ACEVES HERNÁNDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Determinación de la Actividad Catalítica del CYP-450
empleando Hidruro de Silicio como donador de Electrones.

que presenta la pasante: Sandra Selene Ortiz Pérez
con número de cuenta: 40001441-2 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Agosto de 2007.

PRESIDENTE	<u>QFI. Leticia Zuñiga Ramirez</u>	
VOCAL	<u>Dr. Juan Manuel Aceves Hernández</u>	
SECRETARIO	<u>QFI. Guadalupe Koizumi Castro</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Jazmín Flores Monroy</u>	

Esta tesis fue realizada en la Sección de Estudios de Postgrado e Investigación, en el Departamento de Bioquímica y Farmacología de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y en el Departamento de Física de la Escuela Superior de Física y Matemáticas del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría y dirección de la Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández.



AGRADECIMIENTOS

A mi Asesora de Tesis; Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández por su infinita generosidad y paciencia, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un ambiente de confianza y amistad. Gracias y que Dios te bendiga.

Al Dr. Juan Manuel Aceves Hernández; por su confianza al enviarme a la ESM para llevar a cabo este trabajo de tesis. Gracias.

Al Dr. José Trujillo Ferrara y Dr. Daniel Ramírez Rosales; por sus aportaciones y apoyo durante el desarrollo de este trabajo. Gracias.

A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica de la ESM; Dr. José Correa, Dr. Araujo, Jessica, Félix, Arthur y al Sr. José por su calidez y compañerismo al compartir su experiencia y su tiempo conmigo durante la realización de los experimentos. Al Sr. Nachito del Laboratorio de RPE, por su paciencia y buen humor durante mi trabajo en este laboratorio. ¡Muchas Gracias!

A mis sinodales; las profesoras Leticia Zúñiga, Jazmín Flores, al profesor Luis Alberto Parra y con mucho cariño a la profesora Guadalupe Koizumi, quienes con sus comentarios y sugerencias me permiten concluir con esta tesis. Gracias.

Mi más profundo agradecimiento a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM porque desde que soy universitaria se que la vida esta llena de retos, metas y sueños por cumplir que muchas de veces no son fáciles y requieren de un gran esfuerzo y dedicación.

A Dios; por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y mi camino. Gracias por permitirme existir en este tiempo y espacio.

A mi Daddy; por el amor que me brindas y los hábitos que sin conciencia te copié y que ahora me hacen ser la persona que soy. Gracias por mi casa y nuestra familia, por tu amor, ejemplo, paciencia, trabajo y compromiso. ¡Te Amo!

A mi Ma; porque me enseñaste que el amor puede ser infinito, aunque quepa en un solo corazón y que no importa lo lejos que me lleven mis sueños, siempre podré volver a casa y a tu lado. Gracias por ser mi consejera, por haberme hablado de Dios y por haber hablado a Dios de mí. Gracias por la comida en la mesa y mi cama tendida todos los días después de la escuela, por amar a mis hermanos, a mi papá y a mí. ¡Te Amo!

A Brenda; por ser mi hermana, cómplice y amiga, desde la infancia hasta el día de hoy. Por darme tantos años felices de compañía, cariño, atención y apoyo. ¡Te Quiero Mucho!

A Geovanni; por llegar a mi vida y ser una fuente inagotable de cariño. Porque Dios se manifiesta de muchas maneras y tú eres la prueba de ello. Porque tu amor sincero y espontáneo llenas mis días de paz y felicidad. ¡Te Quiero Mucho!

A Kathya; por ser mí casi hermana, por enseñarme a compartir más allá de la familia. ¡Te Quiero!

A Uriel; porque eres la persona que se ha atrevido a compartir conmigo su vida, por entregarme tú cariño y apoyo. Porque en tu compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. Gracias por llegar a mi vida para ser mi mejor amigo. Que ésta sea la prueba de que juntos podemos lograr todo lo que nos proponemos. ¡Te Amo!

A Mashenka, Eva, Martha, Alberto, Viquez (Papapau), David (Morris), Gilberto (Toluco), Rigoberto (Nieves), Israel (Snoopy); por demostrarme que la verdadera amistad existe, los quiero porque cuando dude de ella, ustedes me demostraron que es un sentimiento auténtico e incondicional. Gracias porque su amistad y compañía me llenaron de momentos de inmensa alegría y experiencias inolvidables que guardaré por siempre con mucho cariño en mi corazón. ¡Los Quiero Mucho!

A Karla, Ma. Luisa, Rocío, Ma. de Jesús, Aureola, Elizabeth, Marisol, Amilcar, Rigoberto (González), Ernesto, Luis Martín, Rodrigo, Gabriel, Magnolia, Raúl, Wong, Ricardo y Montuy; por su compañía, sepan que forman parte de muchos recuerdos especiales de mi vida durante la universidad. ¡Los Quiero!

A los maestros de la FES Cuautitlán; por la paciencia, compromiso y dedicación con que me formaron profesionalmente. Gracias por proveerme del vehículo mediante el cual alcanzaré mis metas y cumpliré mis sueños. ¡Muchísimas Gracias!

A los compañeros y amigos; Q's, IQ's, QFB's 26's, 27's y 28's; porque me acompañaron por mi camino a través de la FES Cuautitlán.

CONTENIDO GENERAL

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE	II
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE GRÁFICAS	

ABREVIATURAS

ϵ	Coeficiente de Extinción Molar ($\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
β	Magnetón de Bohr, $\beta = ek/2mc = 0.927 \times 10^{-20} \text{ erg gauss}^{-1}$
μL	Microlitro (10^{-6} L)
μM	Micromolar (10^{-6} M)
ATP	Adenosín Trifosfato
CO	Monóxido de Carbono
CO₂	Dióxido de Carbono
CuCl₂	Cloruro de Cobre
CYP-390	Citocromo P-390
CYP-420	Citocromo P-420
CYP-450	Citocromo P-450
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DPPH	Difenil-Picril-Hidracilo
e⁻	Electrón
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FAD	Flavinadenindinucleótido
Fe⁺²	Hierro Ferroso
Fe⁺³	Hierro Férrico
FMN	Flavinmononucleótido
g	Gramo
g	Factor Espectroscópico
g	Aceleración Centrípeta
G	Gauss
GHz	Gigahertz (10^9 Hz)
h	Constante de Planck
H₀	Campo

H₂	Hidrógeno
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
Hz	Hertz
H[⦿]	Hidruro de Silicio
Kg	Kilogramo
Km	Constante de Michaelis
M	Molar
mg	Miligramo (10 ⁻³ g)
MHz	Megahertz (10 ⁶ Hz)
mL	Mililitro (10 ⁻³ L)
mM	Milimolar (10 ⁻³ M)
mT	Militesla (10 ⁻³ T)
mV	Milivolt (10 ⁻³ V)
Na₂CO₃	Carbonato de Calcio
NAD⁺	Nicotinamida Adenindinucleótido Oxidado
NADH	Nicotinamida Adenindinucleótido Reducido
NADP⁺	Nicotinamida Adenindinucleótido Fosfato Oxidado
NADP⁺® (Sigma)	Nicotinamida Adenindinucleótido Fosfato Oxidado ® (Sigma)
NADPH	Nicotinamida Adenindinucleótido Fosfato Reducido
NADPH® (Sigma)	Nicotinamida Adenindinucleótido Fosfato Reducido ® (Sigma)
nm	Nanómetro (10 ⁻⁹ m)
nM	Nanomolar (10 ⁻⁹ M)
O₂	Oxígeno
°C	Grado Celsius
R	Coficiente de Correlación
R²	Coficiente de Determinación
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
rpm	Revoluciones por Minuto
s	Espín
T	Tesla
UV-VIS	Ultra Violeta – Visible
V	Potencial Eléctrico
ν	Frecuencia
V_{máx}	Velocidad Máxima

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1.	Características Generales del CYP-450.....	5
1.1.1.	Isoformas del CYP-450.....	7
1.1.2.	Sitio Activo y Ciclo Catalítico del CYP-450.....	8
1.1.3.	Reacciones de hidroxilación y N-desmetilación catalizadas por CYP-450.....	10
1.2.	Características generales del Hidruro de Silicio.....	12
1.3.	Resonancia Paramagnética Electrónica.....	15
2.	Justificación.....	20
3.	Hipótesis.....	22
4.	Objetivos.....	22
4.1.	Objetivo General.....	22
4.2.	Objetivos Específicos.....	22
5.	Metodología.....	23
5.1.	Obtención de CYP-450.....	23
5.1.1.	Determinación y cuantificación del CYP-450.....	24
5.2.	Reducción de NADP ⁺ ® (Sigma) con Hidruro de Silicio.....	25
5.2.1.	Determinación del espectro de absorción de luz del NADP ⁺ ® (Sigma), NADPH® (Sigma), NADP ⁺ ® (Sigma) + H [⊖] e H [⊕]	25
5.3.	Determinación de la actividad catalítica de CYP-450.....	26
5.3.1.	Curva Estándar para la determinación de <i>p</i> -aminofenol.....	26
5.3.2.	Curva Estándar para la determinación de Formaldehído....	26
5.3.3.	Determinación de la actividad catalítica del CYP-450 utilizando NADP ⁺ ® (Sigma) e H [⊖] y Anilina.....	27
5.3.4.	Determinación de la actividad catalítica del CYP-450 utilizando NADP ⁺ ® (Sigma) e H [⊖] y N-metilanilina.....	28
5.4.	Determinación de la transferencia de electrones en el sistema CYP-450, NADP ⁺ ® (Sigma), H [⊖] y Sustrato; mediante RPE.....	29

6.	Resultados.....	30
6.1.	Obtención y Determinación de CYP-450.....	30
6.2.	Espectro de Absorción de luz experimental del NADP ⁺ ® (Sigma), NADPH® (Sigma), NADP ⁺ ® (Sigma) + H ⁺ e H ⁺	31
6.3.	Actividad catalítica de CYP-450.....	33
6.3.1.	Curva Estándar para la cuantificación de <i>p</i> -aminofenol y Formaldehído.....	33
6.3.2.	Actividad catalítica de CYP-450 a partir del sistema NADP ⁺ ® (Sigma) e H ⁺	34
6.3.2.1.	Actividad catalítica de CYP-450 empleando H ⁺ y Anilina como sustrato.....	35
6.3.2.2.	Actividad catalítica del CYP-450 empleando H ⁺ y N-metilanilina como sustrato.....	36
6.4.	Transferencia de electrones en el sistema CYP-450, NADP ⁺ ® (Sigma), H ⁺ y Sustrato utilizando RPE.....	37
7.	Discusión.....	39
7.1.	Reducción de NADP ⁺ ® (Sigma) por Hidruro de Silicio.....	39
7.2.	Actividad del CYP-450.....	41
7.2.1.	Hidroxilación catalizada por el CYP-450 empleando Anilina como sustrato.....	41
7.2.2.	N-desmetilación catalizada por el CYP-450 empleando N-metilanilina como sustrato.....	43
7.2.3.	Resonancia Paramagnética de Electrones.....	43
8.	Conclusiones.....	45
9.	Referencias.....	46
9.1.	Referencias Web.....	53
10.	Anexos.....	54
10.1.	Artículo sometido a revisión.....	54
10.2.	Experimental Biology Meeting 2007.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del sistema CYP-450 en la membrana del retículo endoplásmico.....	6
Figura 2. A) Complejo formado entre el Fe ⁺³ del grupo hemo del CYP-450 y CO. B) Espectro del UV Visible del CYP-450.....	6
Figura 3. Interacción del grupo hemo; Sitio Activo CYP-450. Hemo, residuo de cisteína y agua	8
Figura 4. Ciclo catalítico de las enzimas del complejo multienzimático CYP-450.....	9
Figura 5. Mecanismo de transferencia de electrones del CYP-450 reductasa al CYP-450	10
Figura 6. Reacciones de oxidación catalizadas por el CYP-450. A) Hidroxilación. B) N-desmetilación.....	11
Figura 7. Disolución del hidruro de silicio en agua.....	12
Figura 8. Estructura del silsesquioxano.....	13
Figura 9. Aniones del hidruro encajados intersticialmente dentro de la estructura de silsesquioxano mediante una reacción generada por plasma.....	13
Figura 10. Disociación del hidruro de silicio en medio acuoso.....	14
Figura 11. Ruta metabólica para la producción creciente del NADH y del ATP después del tratamiento con el hidruro de silicio.....	15
Figura 12. Conformación del sistema de Resonancia Paramagnética Electrónica.....	16
Figura 13. Espectro electromagnético en donde se localiza la frecuencia 10 ⁶ -10 ⁸ Hz para RMN y de 10 ¹⁰ -10 ¹¹ Hz para RPE.....	18
Figura 14. Espectro diferencial del complejo formado entre monóxido de carbono (CO) y CYP-450. Microsomas de hígado de conejo fueron gasificados con CO y tratados con hidrosulfito de sodio.....	24

Figura 15. Espectro del UV-Visible obtenido del CYP-450 de hígado de rata reducido con hidrosulfito de sodio y burbujeado con CO.....	30
Figura 16. Espectro del UV-VIS obtenido a partir de NADP ⁺ ® (Sigma).....	31
Figura 17. Espectro del UV-VIS obtenido a partir de NADPH® (Sigma).....	31
Figura 18. A) Espectro del UV-VIS obtenido a partir del sistema NADP ⁺ ® (Sigma) e H [⊙] . B) Espectro del UV-VIS obtenido del NADP ⁺ ® (Sigma) que fue reducido con diferentes concentraciones de H [⊙]	32
Figura 19. Espectro del UV-VIS de H [⊙]	33
Figura 20. A) Espectros RPE que ilustran al CYP-450 (Fe ⁺³) de microsomas de hígado de conejo. B) CYP-450 reducido por el donador de electrones H [⊙] a Fe ⁺² . C) Sistema CYP-450, NADP ⁺ ® (Sigma), H [⊙] y anilina. Condiciones: ganancia 2x1000, potencia 25, tiempo 2 min.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de CYP-450 en microsomas de hígado de conejo.....	30
Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos de la hidroxilación de anilina por CYP-450 y dos sistemas reductores diferentes; NADPH® (Sigma) y NADP ⁺ ® (Sigma) con hidruro de silicio.....	37

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Actividad catalítica de CYP-450 utilizando anilina como sustrato. Concentraciones de anilina: 6.6x10 ⁻² , 0.2, 0.6, 1.8, 5.4 mM e hidruro como donador de electrones.....	35
Gráfica 2. Actividad catalítica de CYP-450 utilizando N-metilanilina como sustrato Concentraciones 3.1x10 ⁻² , 6.2x10 ⁻² , 1.25x10 ⁻¹ , 2.5x10 ⁻¹ , 5x10 ⁻¹ , 1, 2 y 4 mM e hidruro como donador de electrones.....	36

1. INTRODUCCIÓN.

El CYP-450 es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos, el cual es un compuesto químico ajeno a un organismo vivo.

El CYP-450 pertenece a una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias hasta mamíferos. Ya se han identificado más de 2000 isoformas de esta enzima.

Todos los CYP-450s conocidos se nombran siguiendo un criterio común y se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud en la secuencia del ADN que los codifica. Las familias 1, 2 y 3 están constituidas por enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de familias incluyen CYP-450s que intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos.

El término xenobiótico también se utiliza para referirse a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 100 años.

Una de las características más significativas de los CYP-450 que metabolizan xenobióticos es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis. Las oxidaciones catalizadas por el CYP-450 son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH; para las que utiliza oxígeno molecular. Como consecuencia de éstas reacciones el CYP-450

acelera la eliminación del organismo de gran número de fármacos y compuestos tóxicos, pero también es el responsable de la activación de toxinas o carcinógenos ⁽¹⁾.

Los compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior se conocen con el nombre genérico de xenobióticos. Se trata de compuestos de naturaleza química muy variada, algunos de los cuales son de origen natural, entre los que destacan las micotoxinas o los alcaloides, si bien la inmensa mayoría son productos originados por la propia actividad humana, como los contaminantes ambientales o los compuestos químicos de síntesis.

Estos compuestos pueden acceder a nuestro organismo mediante ingestión, inhalación, por vía parenteral o a través de la piel. Entre los mismos se incluyen fármacos, cosméticos, aditivos alimentarios, pesticidas, productos de uso doméstico, derivados de la combustión de carburantes, residuos procedentes de la industria química, etc.

Los xenobióticos no son utilizados como nutrientes, por lo que no se incorporan a las rutas bioquímicas del metabolismo intermediario y no son degradados a través de éstas vías metabólicas. Se trata, en general, de compuestos de naturaleza lipofílica por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, acceder al interior de las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico. Al mismo tiempo, su eliminación del organismo es difícil, dado que la excreción de compuestos no volátiles se realiza a través de fluidos de naturaleza acuosa, principalmente orina ⁽¹⁾.

Ante ésta situación, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos alternativos para acelerar la eliminación de estos compuestos.

Se trata de una serie de enzimas no integradas en las vías del metabolismo energético o intermediario del organismo y cuyos sustratos son los xenobióticos. Su función es la de convertir los xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y por tanto, más fácilmente excretables.

El papel de estas enzimas es clave para la supervivencia celular. De no existir tales vías metabólicas, una vez en el interior del organismo los xenobióticos tenderían a acumularse alterando el equilibrio celular y provocando alteraciones funcionales e incluso la muerte celular.

Al conjunto de procesos enzimáticos a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo para su neutralización y eliminación se les conoce como reacciones de biotransformación o de metabolización de xenobióticos. Tradicionalmente estos procesos se han agrupado en dos fases o etapas.

En la Fase 1 los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles gracias a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo).

En la Fase 2 los xenobióticos, o los metabolitos generados por las reacciones de Fase 1, se combinan con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados.

En general, las enzimas de Fase 1 son capaces de transformar múltiples sustratos y catalizar reacciones diferentes. Se trata de proteínas catalíticas de naturaleza muy diversa, entre los que se incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, como el CYP-450 o la flavinmonooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa o estererasas, amidasas hepáticas y plasmáticas. El CYP-450 es sin duda el miembro más destacado de este grupo de enzimas y el que ha sido más ampliamente estudiado ⁽¹⁾.

Las enzimas del CYP-450 corresponden a la familia de las monooxigenasas las cuales catalizan una gran variedad de reacciones como la hidroxilación alifática y de carbonos aromáticos, N- y O-desalquilación, S-oxidación y epoxidación de olefinas [1], etc.

Durante su ciclo catalítico estas enzimas necesitan la transferencia de dos electrones, el primero se transfiere de NADPH por NADPH-CYP-450 reductasa, reduciendo el átomo de ión férrico a su estado ferroso; el segundo electrón junto con un protón son transferidos a las especies dioxi-ferrosas para proporcionar un intermediario hierro-hidroperoxo ($\text{Fe}^{+3}\text{-OOH}$) [2]. El segundo electrón puede provenir tanto de la enzima NADPH-CYP-450 reductasa o en algunos casos del citocromo b_5 [3].

Dada la importancia de las enzimas del CYP-450 en la biosíntesis de muchos compuestos endógenos así como la biotransformación de xenobióticos [4], es importante tener un sistema *in vitro* el cual permita evaluar dichas reacciones a bajo costo, ya que el uso de estas enzimas en procesos de bioremediación y en la síntesis de compuestos es limitado debido al uso de NADPH® (Sigma).

En este sentido, muchos estudios se han llevado a cabo para obtener una fuente de NADPH para las reacciones de CYP-450; para este fin se ha utilizado un sistema regenerador utilizando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, pero este sistema es costoso [5].

Por lo anterior, el presente trabajo se propone estudiar las reacciones de hidroxilación y N-desmetilación catalizadas por el CYP-450, utilizando un sistema reductor que involucra al NADP⁺ y al hidruro de silicio, el cual permitirá el estudio de reacciones de biotransformación a un menor costo.

Los compuestos binarios de hidrógeno reciben el nombre genérico de hidruros. El hidrógeno, que forma compuestos binarios con la mayor parte de los elementos, tiene una electronegatividad un poco mayor que la mediana de la electronegatividad de todos los elementos de la tabla periódica.

Por ello, el hidrógeno se comporta como un no metal débilmente electronegativo y forma compuestos iónicos con metales muy electropositivos, y compuestos covalentes con todos los no metales. Además, el hidrógeno forma hidruros metálicos con algunos de los metales de transición ^(II).

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CYP-450.

Las primeras evidencias sobre las enzimas del CYP-450 fueron descubiertas en 1955 por Axelrod y Brodie [6-7], quienes las aislaron y caracterizaron a partir del retículo endoplásmico liso (Figura 1) de hígado de rata y demostraron que son capaces de oxidar diversos compuestos.

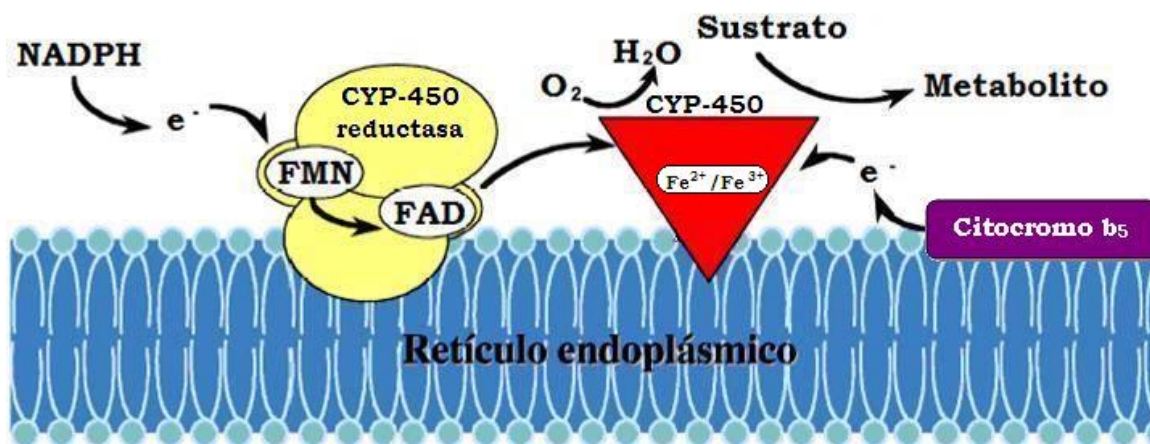


Figura 1. Localización del sistema CYP-450 en la membrana del retículo endoplásmico.

En 1957 mientras Martín Klingenberg [8] estudiaba la reacción de reducción catalizada por citocromo b_5 en microsomas de hígado de rata, encontró otro pigmento capaz de enlazar monóxido de carbono (CO) y dar un pico en 450 nm (Figura 2), al cual en 1960, Omura y Sato [9-10] le dieron el nombre de CYP-450.

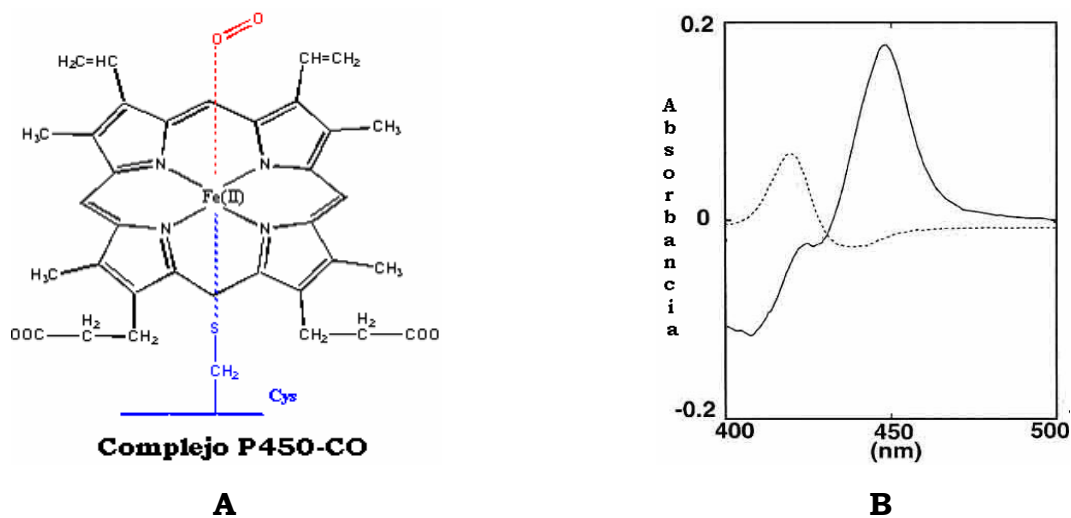


Figura 2. A) Complejo formado entre el Fe^{3+} del grupo hemo del CYP-450 y CO.

B) Espectro del UV Visible del CYP-450.

1.1.1. ISOFORMAS DEL CYP-450.

En 1966 los estudios realizados por Imai y Sato [11] evidenciaron la presencia de más de una forma del CYP-450, al comparar las propiedades espectrales y funcionales del CYP-450 extraído de ratas testigo contra ratas tratadas con 3-metilclorantreno.

En 1968, por medio de estudios espectrofotométricos se identificaron 7 isoformas del CYP-450 de microsomas de hígado, entre las que se encuentran: CYP-450 (reducida) [8], CYP-420 (desnaturalizada) [10], la forma CYP-390 (con sustrato) [12-16]; por lo que se concluyó que se trataba de un complejo multienzimático.

Entre 1970 y 1980 fueron aisladas varias isoformas [15-18], en las que se determinó la especificidad a su sustrato, las secuencias de sus aminoácidos y los genes que codifican estas proteínas.

La nomenclatura que se ha empleado para designar a las diferentes isoformas del CYP-450 consiste en usar las letras CY para indicar que pertenece al sistema de citocromos, la P para referir al pico característico para estas enzimas en el espectro visible a 450 nm, el primer número a la familia a la cual pertenece, la siguiente letra a la subfamilia y el último número a la forma individual de citocromo [19], ejemplos de estas son CYP2C9 y CYP2B4.

La subfamilia CYP2C esta integrada por 28 isoformas, 4 de ellas han sido encontradas en el humano CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19. La CYP2C9 es una de las subfamilias del CYP-450 que se encuentra

principalmente en mamíferos [20] existen reportes de enzimas CYP2C en perro, mono, ratón y caballo [21].

Diversos miembros de la subfamilia CYP2B metabolizan una gran cantidad de xenobióticos, permitiendo en algunos casos la activación de protoxinas o procancerígenos [22]. Entre los xenobióticos que dan origen a especies tóxicas se encuentran: el bromobenceno [22-23], cocaína [24-25], paratión [26] y anilina [27].

Hasta 1995, se habían identificado cerca de 220 isoenzimas del CYP-450, entre las que destacan por su participación en el metabolismo de xenobióticos la CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E y CYP3A [19].

1.1.2. SITIO ACTIVO Y CICLO CATALÍTICO DEL CYP-450.

Durante muchos años se tuvo gran interés en conocer la estructura del CYP-450, particularmente su sitio activo [26, 28, 29], los estudios realizados con tal propósito, evidenciaron que el sitio activo está constituido principalmente por un grupo hemo (hierro y protoporfirina IX), en donde el hierro forma dos enlaces, uno de ellos con un residuo de cisteína y otro con una molécula de agua (Figura 3).

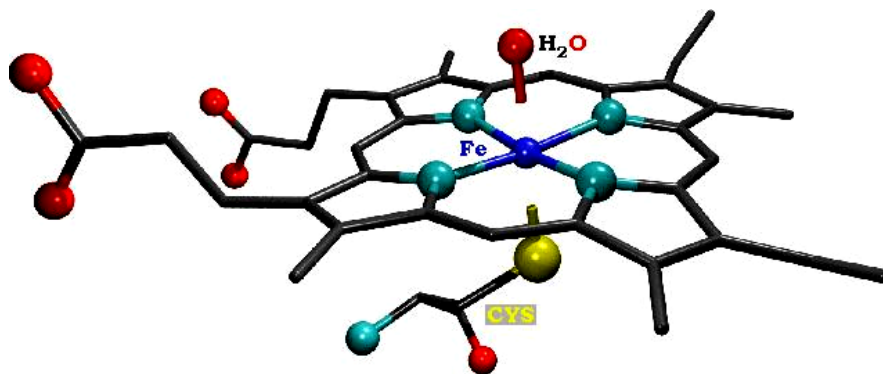


Figura 3. Interacción del grupo hemo; Sitio Activo CYP-450.
Hemo, residuo de cisteína y agua [11].

Como se muestra en la Figura 4, el ciclo catalítico de las enzimas del CYP-450 se inicia mediante la unión del sustrato al hierro del grupo hemo, provocando el desplazamiento de la molécula de agua y el cambio en el espín del hierro de un estado de bajo espín a uno de alto espín. Con ello el hierro pasa de un estado hexacoordinado a uno pentacoordinado [30-32].

El enlace del sustrato facilita la reducción del hierro del grupo prostético hemo al estado ferroso y origina un cambio conformacional de la enzima.

En la tercera etapa del ciclo catalítico, una vez que se ha reducido el hierro se enlaza oxígeno molecular dando origen a un complejo di-oxígeno ferroso $[\text{Fe}^{2+}\text{O}_2]$ muy inestable [33], que sufre una rápida conversión a un compuesto estable, mediante la transferencia de un electrón (e^-). La segunda reducción origina el complejo $[\text{Fe}^{2+}\text{O}_2^{-2}]$, el cual reacciona con dos protones, rompiendo el enlace O-O generando agua y el complejo $[\text{Fe}-\text{O}]^{+3}$ [34], tal como se muestra en la Figura 4.

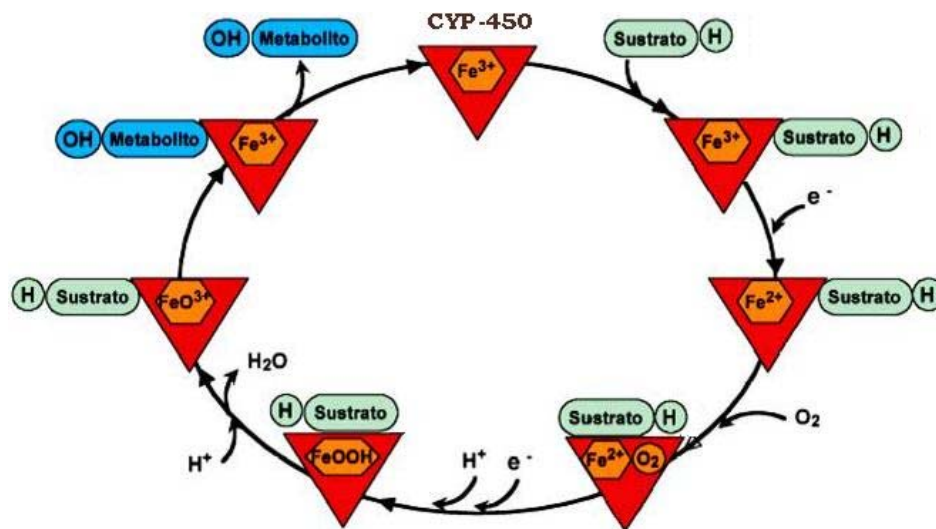


Figura 4. Ciclo catalítico de las enzimas del complejo multienzimático CYP-450 [35-36].

En la última etapa el átomo de oxígeno se transfiere al sustrato dando origen al producto hidroxilado que finalmente se libera del sitio activo de la enzima la cual regresa a su estado inicial.

Las reacciones de reducción que ocurren en el ciclo catalítico, se llevan a cabo mediante la transferencia de un electrón a partir del NADPH por la enzima CYP-450 reductasa, o del citocromo b₅ (Figura 5), estas enzimas al igual que el CYP-450, también forman parte de la membrana y están constituidas por flavinmononucleótido (FMN) y por flavinadenindinucleótido (FAD).

La transferencia del electrón a partir de la CYP-450 reductasa o del citocromo b₅, depende del sustrato o de la especie de CYP-450 involucrada, ya que hay algunas isoformas en las cuales se estimula su actividad cuando la transferencia es a través de citocromo b₅ y otras que son inhibidas [35-37].

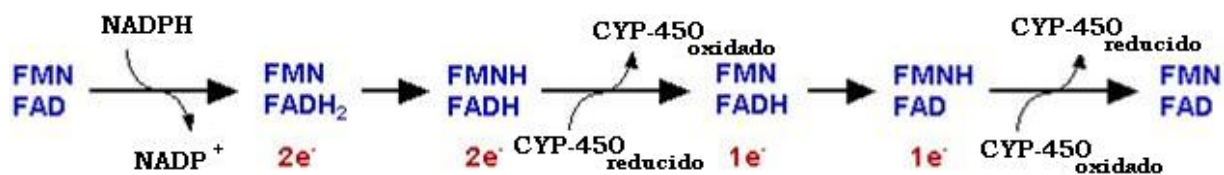


Figura 5. Mecanismo de transferencia de electrones del CYP-450 reductasa al CYP-450 (IV).

1.1.3. REACCIONES DE HIDROXILACIÓN Y N-DESMETILACIÓN CATALIZADAS POR CYP-450.

El sistema CYP-450 está involucrado en el metabolismo de varios endobióticos y xenobióticos [38-39] y posee por lo menos tres diferentes mecanismos de biotransformación [40]. El primero se conoce por su actividad como monooxigenasa, en esta reacción, la enzima solo transfiere un átomo de oxígeno al sustrato (Figura 6).

Estas reacciones incluyen: hidroxilación, epoxidación, desaminación, sulfoxidación, desulfuración y deshalogenación oxidativa, las cuales se llevan a cabo en presencia de NADPH y O₂. En la Figura 6 se ilustran dos reacciones ya conocidas, catalizadas por el CYP-450 en la primera, la anilina es transformada a *p*-aminofenol mediante una reacción de hidroxilación; la segunda reacción corresponde a la transformación de N-metilanilina a anilina y formaldehído mediante una reacción de N-desmetilación.

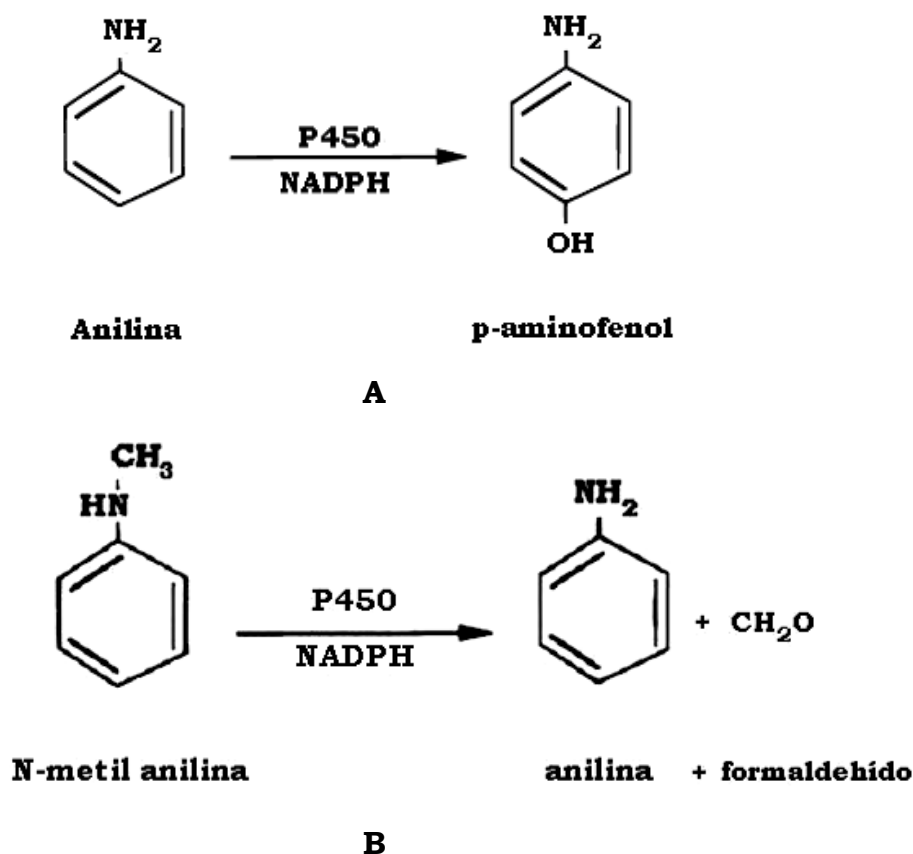


Figura 6. Reacciones de oxidación catalizadas por el CYP-450. A) Hidroxilación. B) N-desmetilación.

La segunda forma de biotransformación del CYP-450 es la liberación de especies de oxígeno reducidas [40-43], en la cual se involucra la transferencia directa de un electrón a partir del CYP-450 a la molécula de oxígeno con la formación de radicales anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

La tercera actividad del sistema CYP-450 se refiere a su actividad como reductasa y se lleva a cabo en condiciones anaerobias e involucra la transferencia directa de un electrón a sustratos que pueden ser reducidos tales como halogenuros de alcanos o quinonas [44].

1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL HIDRURO DE SILICIO.

El hidruro de silicio (H^{\ominus}) es un compuesto recientemente caracterizado, el cual ha sido utilizado para investigar fuentes de energía alternativas de hidrógeno, así como para su uso en la industria, farmacología y bioquímica [45].

El H^{\ominus} surge como un portador sólido para los pequeños aniones de hidrógeno mismos que son liberados en solución acuosa. Este compuesto de bioencapsulado nanométrico coloidal promete ser un increíblemente efectivo atrapador de radicales libres y ayudar en la reducción del estrés oxidativo, gracias a su alto potencial de reducción electroquímica [42]. La Figura 7 nos muestra el análisis particular del proceso de rompimiento que sufre el hidruro de silicio en un sistema acuoso donde a partir de los agregados de estructuras monoméricas del silicato se liberan los iones hidruro (H^{\ominus}) a la solución.

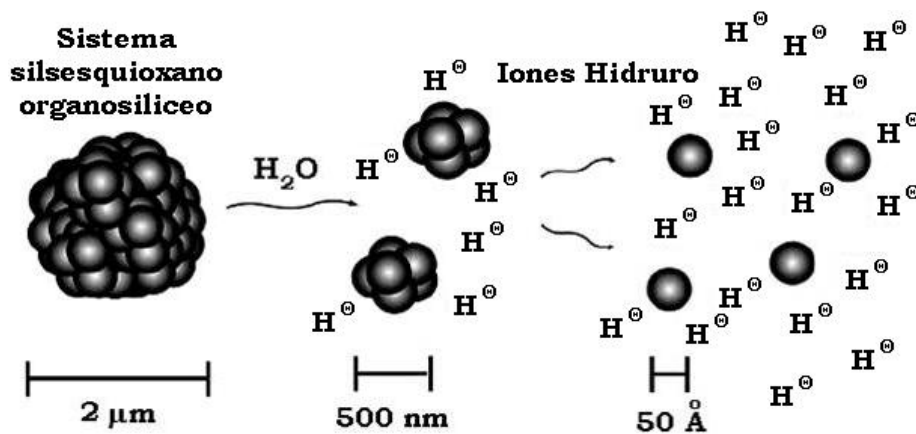


Figura 7. Disolución del hidruro de silicio en agua [42].

El hidruro del silicio puede tener iones hidruro (H^{\ominus}) contenidos en un sistema de silsesquioxano organosilíceo (Figura 8). Es decir en una jaula monomérica de silica en donde los aniones del hidruro están colocados intersticialmente (Figura 9) [42]. Como un compuesto bioencapsulado, la silica actúa como un acarreador coloidal de aniones de hidrógeno en solución.

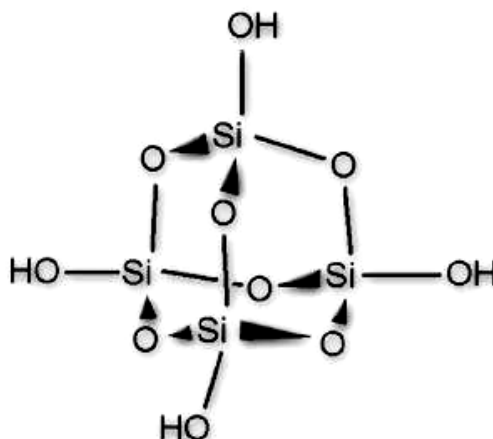


Figura 8. Estructura del silsesquioxano [42].

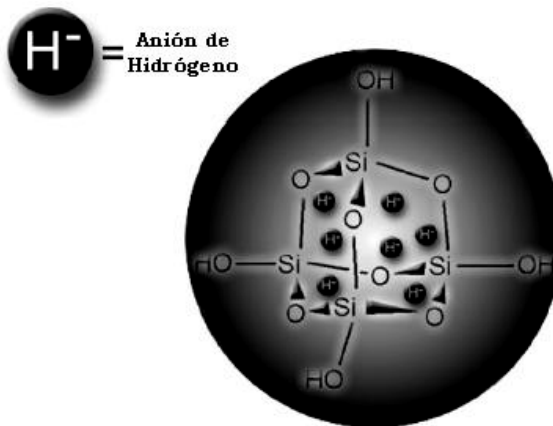


Figura 9. Aniones del hidruro encajados intersticialmente dentro de la estructura de silsesquioxano mediante una reacción generada por plasma [42].

En una solución acuosa (Figura 10), los aniones encajonados intersticialmente del hidruro (A), se disocian [43] y el electrón del anión es donado a algún electrón desapareado (B) de la especie radical libre por ejemplo el radical hidroxilo, produciendo agua a partir de posradicales neutralizados (C).

El hidruro de silicio ha mostrado actividad tanto en sistemas *in vitro* como sistemas *in vivo*, empleándose como antioxidante o agente reductor [60-61].

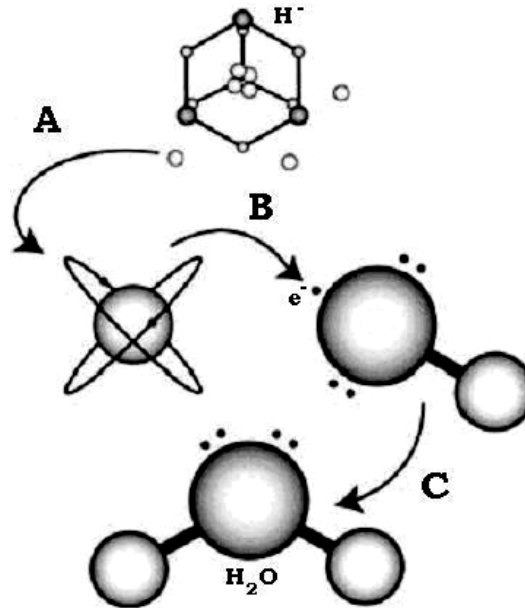


Figura 10. Disociación del hidruro de silicio en medio acuoso. [43]

Un estudio *in vitro* demostró la reducción de NADP^+ con hidruro de silicio el cual actuando como hidruro aniónico, no reacciona violentamente con agua y reporta lecturas estables de potenciales redox mayores a -860 mV por períodos extendidos de tiempo, lo que proporciona una alternativa de producción de hidrógeno como combustible a sistemas celulares bioquímicos. Análisis subsecuentes del compuesto indican que no se induce citotoxicidad e incrementa el NADH en la célula [44].

Un ejemplo de la importancia de la reducción del NAD^+ a NADH en sistemas bioquímicos es la disminución de la concentración de la glucosa y la producción disminuida del lactato que sugiere una actividad glicolítica aumentada y una respiración aeróbica post-piruvato con la regeneración del NADH para llevar a cabo el transporte de electrones al complejo I de la proteína (Figura 11) [44].

Lo anterior sucede cuando se transfiere (A) un electrón (e^-) directamente a través de la ubiquinona o indirectamente por oxidación del succinato hacia el interior (B) de la proteína del complejo III citocromo b_{566}/b_{562} . Lo que activa el metabolismo del citocromo c (C). Al interior (D) del complejo IV- Cu^{+2} del Citocromo oxidado c resulta en el incremento (E) del gradiente de protones, lo que explica la producción aumentada de ATP sintetasa liberada al espacio mitocondrial intermembranal (F).

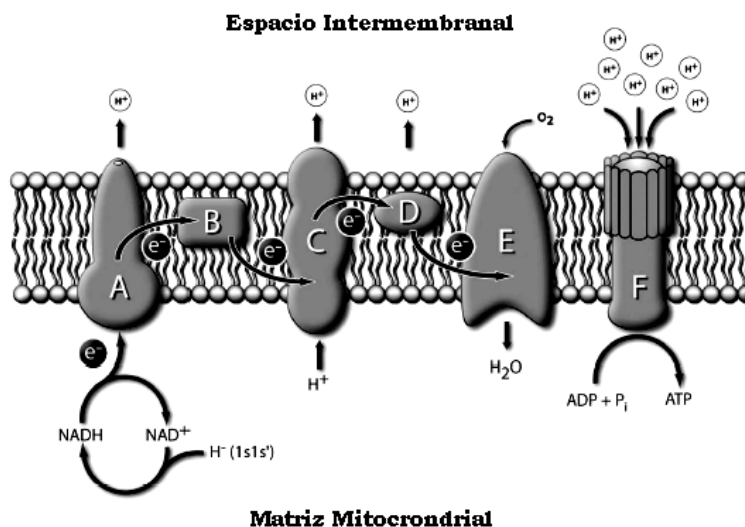


Figura 11. Ruta metabólica para la producción creciente del NADH y del ATP después del tratamiento con el hidruro de silicio [44].

La continuidad en el estudio sobre esta nueva familia de compuestos de hidruro podría demostrar lo invaluable de la actividad en los sistemas bioquímicos, médicos y analíticos [44].

1.3. RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA.

La Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) es una técnica espectroscópica que permite detectar especies con electrones no apareados (Figura 12).

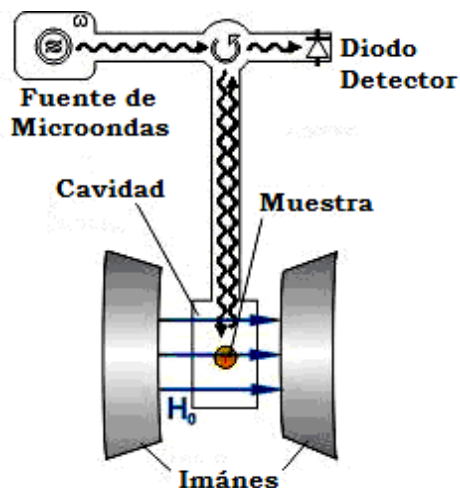


Figura 12. Conformación del sistema de Resonancia Paramagnética Electrónica ^(V).

La espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica hizo su aparición en 1945, al publicar Zavoiski su famoso trabajo [45] en el que dio cuenta de la detección de una absorción de radiofrecuencias (133 MHz) en una muestra de CuCl_2 , bajo un campo magnético de 4.75 mT.

El experimento de Zavoiski se interpretó inmediatamente [46] como una transición de resonancia paramagnética electrónica tal como hoy se conoce. Al año siguiente Zavoiski publicó el primer experimento de resonancia paramagnética electrónica en el rango de las microondas (3 GHz, banda S).

El resultado de Zavoiski contribuyó al desarrollo de su “prima hermana”, la Resonancia Magnética Nuclear, cuyos primeros experimentos se publicaron en 1946, de forma independiente, por Purcell y colaboradores [47] y por Bloch [48]. Este último autor ya puso de manifiesto la importancia de los efectos de la relajación para comprender el fenómeno de la resonancia magnética nuclear e introdujo una descripción fenomenológica de los mismos a través de sus célebres ecuaciones [49], las cuales se aplicaron de inmediato

para describir también el fenómeno de la resonancia paramagnética electrónica.

Desde un primer momento la resonancia paramagnética electrónica se mostró como una fina herramienta para el estudio de entidades paramagnéticas: la sensibilidad de la técnica permite estudiar sistemas (inicialmente sólidos) con una muy baja concentración de centros activos. Ejemplos de ello son materiales con radicales libres o defectos producidos por irradiación, cuya contribución paramagnética es indetectable por técnicas del magnetismo clásico.

Los trabajos experimentales y las interpretaciones teóricas de los grupos de Kazan (en la antigua Unión Soviética) y de Oxford (en Inglaterra) tuvieron una importancia indiscutible en el desarrollo y éxito inicial de la resonancia paramagnética electrónica [64].

Para que un sistema exhiba el fenómeno de resonancia magnética, éste debe de estar compuesto de partículas que poseen un momento magnético y un momento angular. Tanto los núcleos como los electrones satisfacen esta condición. El núcleo tiene un momento magnético miles de veces más pequeño que el de un electrón consecuentemente, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la resonancia paramagnética electrónica son diferentes, ya que los experimentos de RMN se llevan a cabo a 10^6 - 10^8 Hz en el rango de radio frecuencia, mientras que en RPE es 10^{10} - 10^{11} Hz en el rango de microondas (Figura 14), donde diferente tipo de información es obtenida mediante estas dos técnicas. Sin embargo, la teoría fundamental es común entre ambas [65].

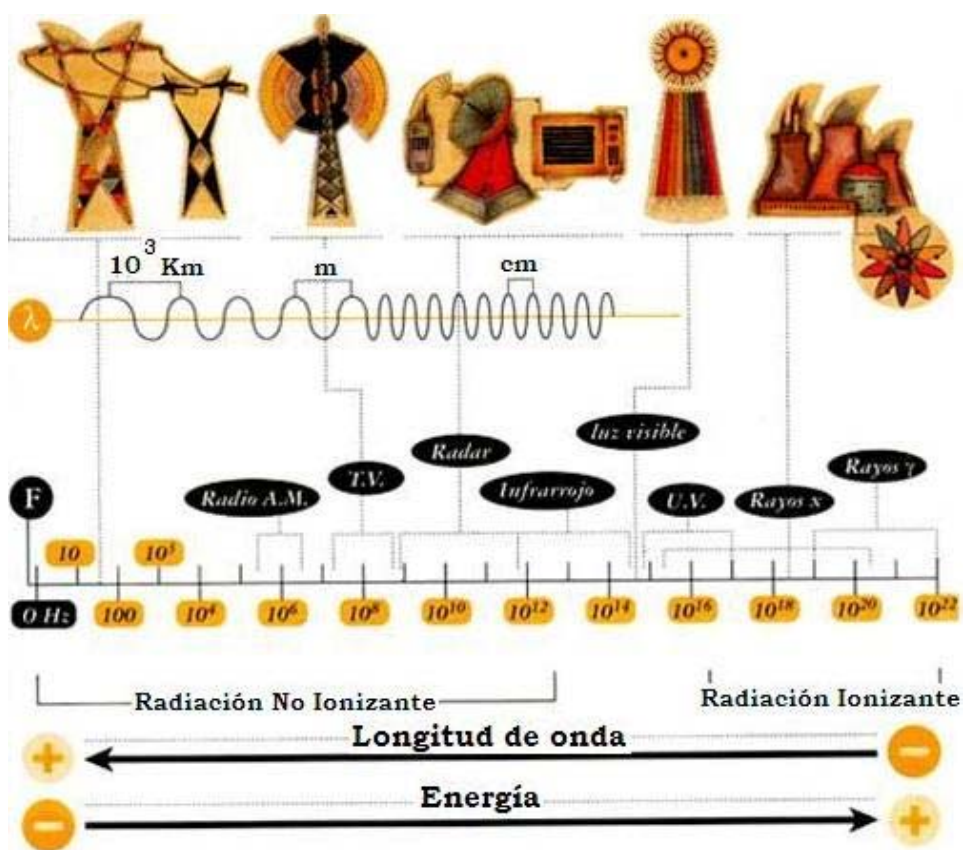


Figura 13. Espectro electromagnético en donde se localiza la frecuencia 10^6 - 10^8 Hz para RMN y de 10^{10} - 10^{11} Hz para RPE (VI).

Un átomo o molécula la cual contiene electrones desapareados tiene un momento angular y posee su correspondiente momento magnético. Los mejores ejemplos son los iones de varios elementos de transición con electrones desapareados en orbitales parcialmente llenos.

Por ejemplo el hierro contenido en el CYP-450 en donde sus orbitales $3d$ crean un dipolo magnético. El hierro (+2) tiene seis electrones d y el hierro (+3) "PARAMAGNÉTICO" tiene cinco electrones d para ser acomodados.

El procedimiento experimental del RPE consiste en colocar la muestra en la cavidad resonante, la fuente de microondas es sintonizada a la

frecuencia de la cavidad resonante y mantenida constante, mientras que la magnitud del campo se varía hasta que se cumple las condiciones de resonancia de la Ecuación 1. Esto puede ser detectado midiendo el cambio en el factor Q de la cavidad resonante cuando la energía de microondas es absorbida por el sistema magnético [66].

$$h\nu_0 = g\beta H_0$$

Ecuación.1

Donde:

h = Constante de Planck

ν_0 = Frecuencia (Hz)

g = Factor g , es conocido como factor espectroscópico.

β = Magnetón de Bohr, $\beta = ek/2mc = 0.927 \times 10^{-20}$ erg gauss⁻¹.

H_0 = Campo

Para un valor de g de 2 y $\nu_0 = 10$ GHz el campo magnético es cercano a 3500 G. En general los trabajos experimentales son llevados a cabo a frecuencias en el rango de 1-100 GHz donde técnicas estándar de microondas pueden ser usadas. Las frecuencias más usadas son de 9 GHz (Banda X), 35 GHz (Banda Q) [66].

2. JUSTIFICACIÓN.

Las enzimas del CYP-450 son de gran importancia ya que éstas se encargan de metabolizar los xenobióticos en el humano formando parte de las enzimas que catalizan las reacciones de biotransformación de Fase 1.

Son muchas las reacciones mediante las cuales esas enzimas transforman a los xenobióticos en moléculas más polares para ser fácilmente eliminables. Una de las principales reacciones es la de hidroxilación razón por la cual a estas enzimas se les conoce también como monooxigenasas, ya que incorporan un átomo de oxígeno en su sustrato con el propósito de hacer a las moléculas más polares para ser fácilmente eliminables.

Sin embargo para que las enzimas del CYP-450 tengan actividad catalítica necesitan la transferencia de 2 electrones, los cuales son suministrados por el NADPH a través de la enzima CYP-450 reductasa. Sin embargo uno de los principales problemas cuando se evalúa la biotransformación de xenobióticos *in vitro* es el uso del NADPH® (Sigma).

Ejemplo de algunos fármacos que han sido evaluados mediante el sistema CYP-450 y NADPH® (Sigma) *in vitro* son la lovastatina, codeína, paracetamol, diazepam y el diclorodifeniltricloroetano (DDT) un plaguicida organoclorado.

La evaluación *in vitro* de éstos y muchos otros tipos de xenobióticos es de gran importancia durante la investigación y desarrollo de nuevos fármacos y otros productos de origen sintético, pues nos permite conocer como estos compuestos podrían ser transformados en el organismo y de una manera más certera determinar los posibles metabolitos que en algunas ocasiones

resultan ser tóxicos. Por lo anterior es de gran importancia contar con un sistema que permita tener NADPH para la evaluación de xenobióticos en reacciones de biotransformación.

En este sentido, muchos estudios se han llevado a cabo para obtener una fuente de NADPH para las reacciones de CYP-450; para este fin se cuenta con un sistema regenerador utilizando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, pero este sistema tiene la característica de ser costoso [50].

El presente trabajo se propuso estudiar las reacciones de hidroxilación y N-desmetilación utilizando un sistema reductor que involucra NADP⁺® (Sigma) e hidruro de silicio, el cual permitirá el estudio de reacciones de biotransformación *in vitro* a un menor costo, dado que el NADPH® (Sigma) es tres veces más caro que el NADP⁺® (Sigma). La reducción de este último con hidruro de silicio resulta ser una opción más económica por el hecho de que la síntesis del agente reductor es de bajo costo.

El costo de 1 g de hidruro de silicio es aproximadamente de \$5.00 por lo que si se considera como opción para reducir al NADP⁺® (Sigma) que tiene un precio de \$1,398.46 la presentación de 250 mg, estaríamos por debajo del costo del NADPH® (Sigma) que se encuentra alrededor de \$3,600.76 la presentación con el mismo contenido (250 mg) ^(VII).

3. HIPÓTESIS.

Si el CYP-450 tiene actividad catalítica *in vitro* empleando sistemas regeneradores de NADPH es posible que también posea actividad catalítica cuando el hidruro de silicio es empleado como donador de electrones.

4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar si el CYP-450 tiene actividad catalítica como monooxigenasa y N-desmetilasa *in vitro* cuando se emplea NADP⁺ reducido con hidruro de silicio.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Obtener microsomas de hígado de conejo para evaluar experimentalmente en un sistema *in vitro* la actividad catalítica de la enzima CYP-450.
2. Establecer la concentración óptima de hidruro de silicio en la cual una mayor cantidad de NADP⁺ es reducido a NADPH.
3. Evaluar la actividad catalítica del CYP-450 en reacciones de hidroxilación y N-desmetilación empleando hidruro de silicio como donador de electrones.
4. Analizar la transferencia de electrones en el sistema CYP-450, NADP⁺® Sigma, H[⊙], sustrato; mediante Resonancia Paramagnética Electrónica.

5. METODOLOGÍA.

5.1. OBTENCIÓN DE CYP-450.

Para la obtención y extracción del hígado se utilizaron conejos machos de la especie Nueva Zelanda cuyo peso oscilaba entre 2.25 ± 0.25 Kg. Los conejos se sacrificaron y mediante exposición de la cavidad torácico-abdominal, se perfundió el hígado *in situ*, por la vena cava inferior con 100 mL de solución fisiológica fría.

Obtención de los microsomas. Se extrajo el hígado, se mantuvo en hielo seco y se homogeneizó por 5 min con 20 mL de sacarosa 0.25 M usando un homogenizador Dispergierstation T 08.10. A partir de éste homogenizado la fracción microsomal se obtuvo por una modificación del método de Manno [51-52].

El homogeneizado se centrifugó a 10,000 *g* por 16 min a 4 °C utilizando una centrífuga Eppendorf 5804R.

Al sobrenadante se le adicionó cloruro de calcio hasta alcanzar una concentración final 8 mM, se agitó y se centrifugó a 20, 000 *g* en una ultracentrífuga Beckman por 28 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y los microsomas contenidos en el precipitado se resuspendieron en 15 mL de una solución de KCl 0.15 M, se agitó y centrifugó nuevamente a 20, 000 *g* por 28 min a 4 °C.

Finalmente, los microsomas se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 con 20% de glicerol y se almacenaron a -70 °C.

5.1.1. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CYP-450.

Obtenidos los microsomas se determinó el contenido de CYP-450 a través del método de Omura y Sato [9,10]. Se diluyó 1 mL de la solución de microsomas en 9 mL de buffer de fosfatos pH 7.4.

Se adicionaron 90 μg de hidrosulfito de sodio para reducir el hierro del grupo hemo, se tomó la muestra de 3 mL la cual sirvió de testigo y el resto se burbujeó con monóxido de carbono de ultra pureza, se realizó un barrido a la muestra desde 200 hasta 900 nm en un espectrofotómetro Cintra 5 UV-Visible para observar el pico característico en 450 nm como se muestra en la Figura 14.

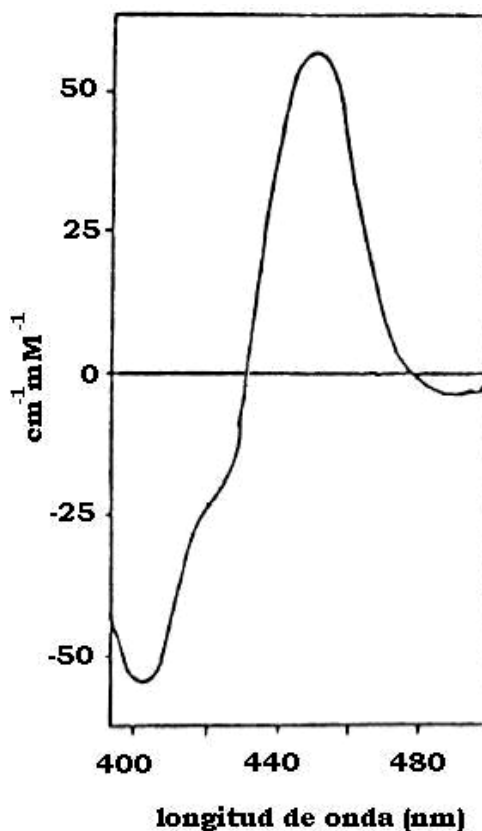


Figura 14. Espectro diferencial del complejo formado entre monóxido de carbono (CO) y CYP-450. Microsomas de hígado de conejo fueron gasificados con CO y tratados con hidrosulfito de sodio.

Para calcular la cantidad de CYP-450 en la muestra se empleó el coeficiente de extinción de $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ [67].

5.2. REDUCCIÓN DE NADP⁺® (SIGMA) CON HIDRURO DE SILICIO.

Antes de llevar a cabo la reacción se determinó si el NADP⁺® (Sigma) era reducido con hidruro de silicio a diferentes concentraciones y diferentes tiempos. Estos experimentos fueron realizados utilizando un espectro Perkin Elmer Lambda 25 UV VIS.

5.2.1. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LUZ DEL NADP⁺® (SIGMA), NADPH® (SIGMA), NADP⁺® (SIGMA) + H[⊖] E H[⊕].

Se preparó una solución de NADP⁺® (Sigma) de concentración 7.0421×10^{-7} mM utilizando buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Se llevó a cabo un barrido para determinar el espectro del UV-VIS correspondiente. Se llevaron a cabo diluciones tales que se obtenga un espectro cuya absorbancia máxima fue por debajo de la unidad. Además, se realizó el espectro del UV-VIS para el H[⊖].

Una vez obtenido éste se hizo un barrido con NADPH® (Sigma) como control.

Finalmente, se realizó el estudio reduciendo NADP⁺® (Sigma) con diferentes cantidades de H[⊖]: 2.9, 5.7, 11.4, 22.9 y 45.7 mg/mL, evaluando la reacción a diferentes tiempos (0, 20, 30 min y 24 hrs).

5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE CYP-450.

Obtenidos los microsomas y cuantificado la cantidad de CYP-450 se determinó su actividad catalítica utilizando anilina como sustrato para evaluar su actividad como monooxigenasa al ser convertida la anilina a *p*-aminofenol. Para evaluar la actividad del CYP-450 como N-desmetilasa se empleó N-metilanilina la que es convertida a anilina y formaldehído producto cuantificable de la reacción.

5.3.1. CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE *p*-AMINOFENOL.

Una muestra de 0.5 mL conteniendo diferentes concentraciones de *p*-aminofenol: 7.5×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 3.0×10^{-3} , 6.0×10^{-3} , 1.2×10^{-2} , 2.4×10^{-2} mM, que se mezclan con 0.25 mL de solución de Na_2CO_3 al 20% y 0.75 mL de solución de fenol al 2% [53]. La mezcla se incubó a 37 °C por 30 min. La concentración de *p*-aminofenol se determinó espectrofotométricamente a 630 nm.

Se preparó el blanco con 1 mL de Buffer, 0.5 mL de Na_2CO_3 y 1.5 mL de fenol para ajustar el equipo.

5.3.2. CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE FORMALDEHÍDO.

Se preparó una solución de formaldehído 2 mM; a partir de la cual se tomó el volumen necesario para obtener las siguientes concentraciones: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mM en 0.5 mL de buffer. A esta solución se le adicionó 0.5 mL de reactivo de NASH (para preparar 250 mL de reactivo: 37.5 g Acetato de Amonio, 0.75 mL Ácido Acético y 0.5 mL Acetilacetona)

[54]. La mezcla se incubó a 58 °C por 5 min. La concentración de formaldehído se determinó espectrofotométricamente a 412 nm.

Se preparó el blanco con 1.4 mL de Buffer y 1.4 mL de reactivo de NASH.

5.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DEL CYP-450

UTILIZANDO NADP⁺® (SIGMA) E H⁺ Y ANILINA.

Los ensayos para la determinación de la actividad catalítica del CYP-450 empleando anilina como sustrato, se realizaron cuantificando la concentración de *p*-aminofenol producido. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se preparó la solución de anilina 80 mM; a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones: 6.6×10^{-2} , 0.2, 0.6, 1.8, 5.4, 16.2 y 48.6 mM.
2. A la anilina se le agregó el volumen de enzima CYP-450 calculada para tener una concentración de 1 nmol.
3. Se agregó el NADP⁺® (Sigma) e H⁺ y se colocó al sistema en incubación por 30 min a 37°C.
4. Transcurrido el tiempo se detuvo la reacción agregando 0.1 mL de ácido tricloroacético al 7.5% a cada tubo de la serie.
5. Los tubos se centrifugaron a 5000 *g* por 10 min.
6. Con 0.5 mL de muestra por tubo se llevó a cabo la determinación de *p*-aminofenol.

Cabe mencionar que la reacción también se llevó a cabo modificándola en el tercer paso, donde el sistema de NADP⁺® (Sigma) se redujo por separado

utilizando al hidruro de silicio, este sistema independiente fue adicionado posteriormente al sistema de anilina y CYP-450.

5.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DEL CYP-450

UTILIZANDO NADP⁺® (SIGMA) E H⁺ Y N-METILANILINA.

Los ensayos para la determinación de la actividad catalítica del CYP-450 empleando N-metilanilina como sustrato, se realizaron cuantificando la concentración de formaldehído producido, la reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. A partir de una solución de N-metilanilina de concentración 40 mM; se obtuvieron las concentraciones 3.1×10^{-2} , 6.2×10^{-2} , 1.25×10^{-1} , 2.5×10^{-1} , 5×10^{-1} , 1, 2 y 4 mM.
2. Colocada la N-metilanilina, se agregó el volumen de enzima CYP-450 calculada para tener una concentración de 1 nmol.
3. Se agregó el CYP-450 a la N-metilanilina y posteriormente se adicionó el sistema NADP⁺® (Sigma) e H⁺ el cual se redujo por separado y se colocó al sistema en incubación por 6 min a 37 °C.
4. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción agregando 50 µL de ácido tricloroacético al 7.5% a cada tubo de la serie.
5. Los tubos se centrifugaron a 8000 g por 10 min.
6. Con 700 µL de muestra por tubo se llevó a cabo la determinación de formaldehído.

5.4. DETERMINACIÓN DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN EL SISTEMA CYP-450, NADP⁺® (SIGMA), H⁺ Y SUSTRATO; MEDIANTE RPE.

Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro Jeol JES-RES 3X a temperatura variable, empleando un dispositivo elaborado en el Laboratorio de mediciones Magnéticas y Biofísica de la ESFM.

La muestra conteniendo 400 μL de CYP-450, 48 mg H⁺, 3.2 mg NADP⁺® (Sigma), 80 μL de Buffer y 600 μL de Anilina 80 mM, se colocó en un tubo de RPE y se introdujo en la cavidad. Las mediciones se llevaron a cabo empleando una frecuencia de 9.2 GHz (Banda X) y los valores de g fueron calculados a partir de las mediciones del campo magnético con una resolución ± 0.01 mT, empleando DPPH como marcador.

6. RESULTADOS.

6.1. OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CYP-450.

Como se puede observar en la Tabla 1, el contenido de CYP-450 fue 3.78 nmol/g Hígado \pm 0.609. Estos resultados corresponden con datos reportados en la literatura [52].

Tabla 1. Contenido de CYP-450 en microsomas de hígado de conejo.

Conejo	g Hígado	nmol	nmol/g Hígado
A	72.6167	255.76	3.52
B	113.963	328.8	2.88
C	110.90	548.86	4.94

En la Figura 15, se muestra el pico característico de CYP-450 obtenido después de haber sido reducidos con hidrosulfito de sodio y burbujeado con CO. Como puede observarse el pico corresponde a 450 nm por lo tanto la absorbancia obtenida de éste fue lo que se utilizó para determinar el contenido de CYP-450 empleando un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 91 mM cm⁻¹ reportado por Omura y Sato [9, 10].

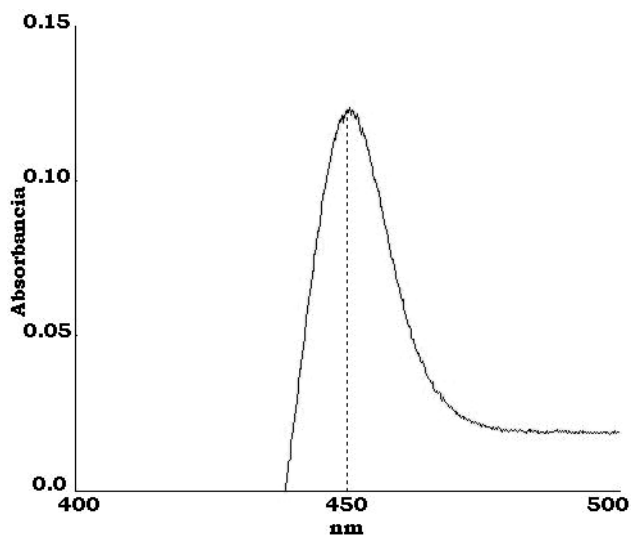


Figura 15. Espectro del UV-Visible obtenido del CYP-450 de hígado de rata reducido con hidrosulfito de sodio y burbujeado con CO.

Una vez determinado el contenido de CYP-450 en la suspensión microsomal ésta se mantuvo a -80°C hasta ser utilizada en la determinación de actividad catalítica de CYP-450.

6.2. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LUZ EXPERIMENTAL DEL NADP^{+} ® (SIGMA), NADPH ® (SIGMA), NADP^{+} ® (SIGMA) + H^{\ominus} E H^{\ominus} .

En la Figura 16 se muestra el espectro del UV-VIS obtenido de NADP^{+} ® (Sigma), el cual tiene 2 picos máximos de absorbancia que corresponden a 210 y 260 nm. En este espectro no se observó el pico a 340 nm, que corresponde a NADPH .

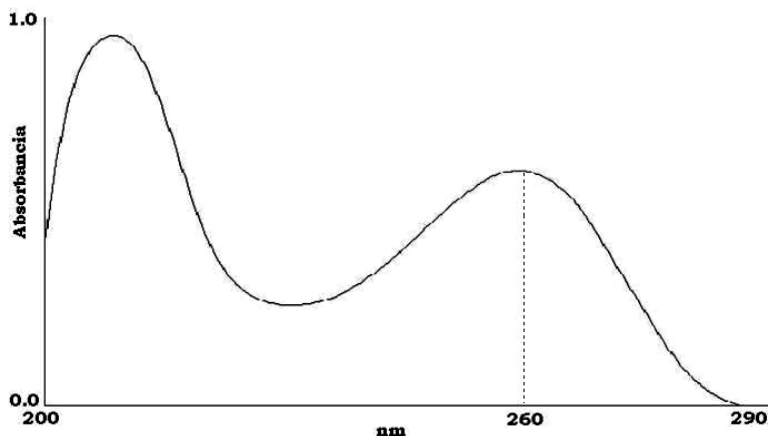


Figura 16. Espectro del UV-VIS obtenido a partir de NADP^{+} ® (Sigma).

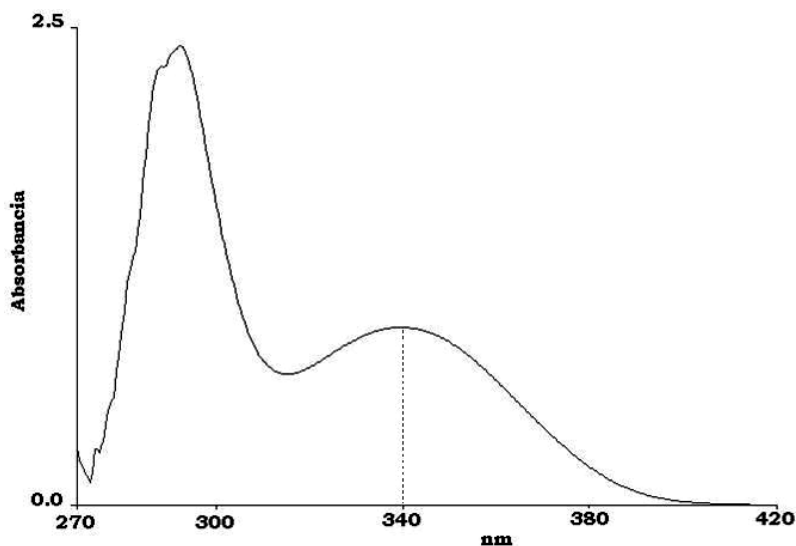


Figura 17. Espectro del UV-VIS obtenido a partir de NADPH ® (Sigma).

Sin embargo, como se observa en la Figura 17, NADPH® (Sigma) si mostró este pico característico de absorción a 340 nm.

Una vez obtenidas las longitudes de onda experimentales a las cuales absorben el NADP⁺® (Sigma) y NADPH® (Sigma) se hizo el espectro del UV-VIS para el NADP⁺® (Sigma) con hidruro de silicio con el propósito de observar si efectivamente éste era capaz de reducir el NADP⁺® (Sigma).

Como se observa en la Figura 18A, el hidruro de silicio redujo el NADP⁺® (Sigma) a NADPH ya que en dicho espectro es posible observar un pico de absorción a 340 nm.

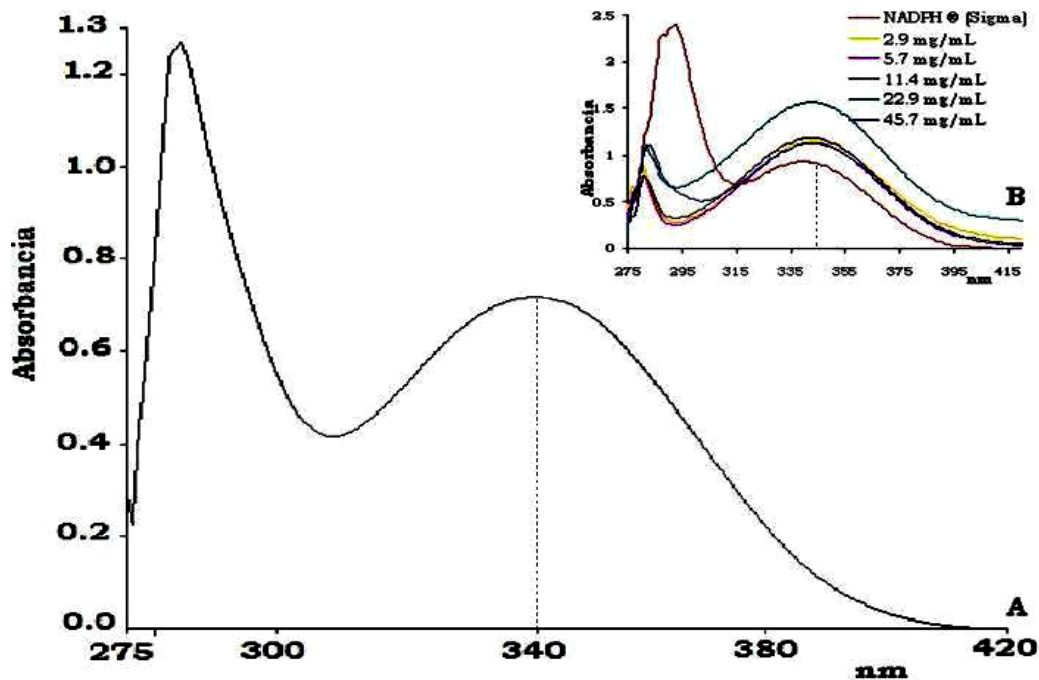


Figura 18. A) Espectro del UV-VIS obtenido a partir del sistema NADP⁺® (Sigma) e H⁰.
B) Espectro del UV-VIS obtenido del NADP⁺® (Sigma) que fue reducido con diferentes concentraciones de H⁰.

Para corroborar que este pico no se debiera al hidruro de silicio, se hizo su espectro de UV-VIS en el cual no se observó ningún pico de absorción a 340 nm como se muestra en la Figura 19.

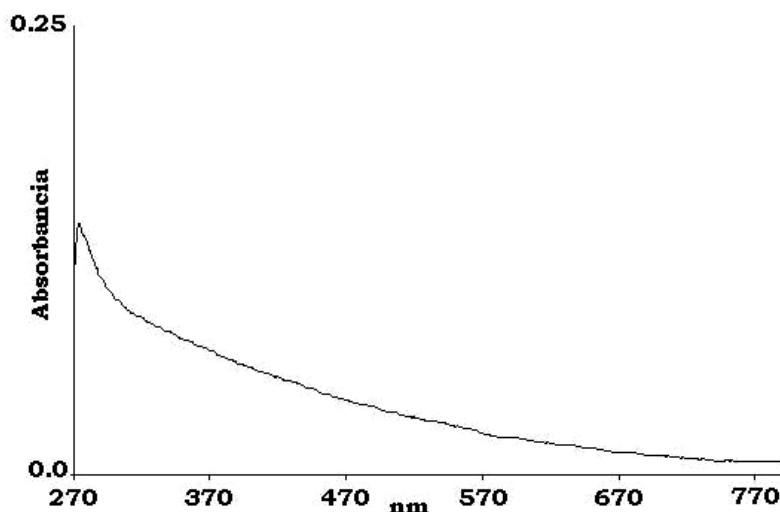


Figura 19. Espectro del UV-VIS de H^o.

Los experimentos de la reducción de NADP⁺® (Sigma) se hicieron evaluando el efecto de la concentración de hidruro de silicio en concentraciones de 2.9, 5.7, 11.4, 22.9 y 45.7 mg/mL; el tiempo de reacción (0, 20 y 30 min) y los resultados obtenidos muestran que la reducción de NADP⁺® (Sigma) fue dependiente tanto de la concentración de hidruro (Figura 18B) así como del tiempo.

6.3. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE CYP-450.

6.3.1. CURVA ESTÁNDAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE *p*-AMINOFENOL Y FORMALDEHÍDO.

La determinación de *p*-aminofenol se realizó de acuerdo a lo reportado por Hildebrandt [55,56].

Los resultados de las curvas de calibración muestran un coeficiente de correlación de $R=0.9992$. La ecuación de la recta obtenida fue (Ecuación 2):

$$y = 4.6603 x - 0.0013$$
$$R^2=0.9985$$

Ecuación.2

Los resultados obtenidos para la determinación de formaldehído se realizaron de acuerdo a lo reportado por Nash [54].

Los resultados de dicha curva de calibración muestran un coeficiente de correlación de $R=0.9999$. (Ecuación 3)

$$y = 0.3358 x - 0.0057$$
$$R^2=0.9999$$

Ecuación.3

6.3.2. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE CYP-450 A PARTIR DEL SISTEMA

NADP⁺® (SIGMA) E H^o.

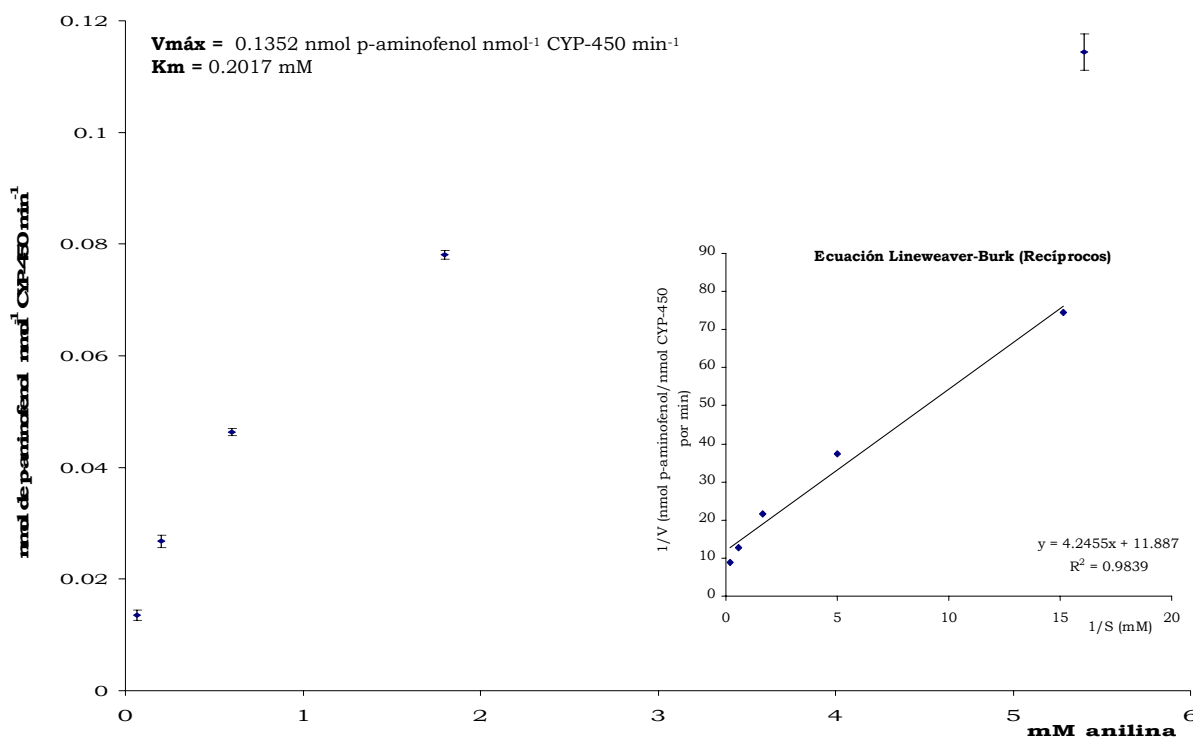
La actividad catalítica de CYP-450 fue evaluada en un sistema de reacción el cual contenía el NADP⁺® (Sigma) e hidruro de silicio junto con el sustrato (anilina o N-metilanilina) y el CYP-450.

Sin embargo, los resultados de la conversión de anilina a *p*-aminofenol, mostraron que la enzima tenía poca actividad catalítica, lo cual podría ser debido a que el hidruro de silicio no permitía la unión del sustrato a la enzima, debido posiblemente a que el hidruro de silicio modifica el estado de oxidación del hierro o se une al sitio activo o en un lugar cercano a éste.

Dicha actividad fue evaluada reduciendo el NADP⁺® (Sigma) con hidruro de silicio antes de que este fuera añadido a la reacción la cual contenía la anilina y el CYP-450.

6.3.2.1. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE CYP-450 EMPLEANDO H⁰ Y ANILINA COMO SUSTRATO.

La concentración de *p*-aminofenol a partir de la conversión de anilina por el CYP-450, NADP⁺® (Sigma) e H⁰ se llevó a cabo con base en el método de Hildebrandt [55, 56]. Se obtuvo la siguiente gráfica que representa la actividad del CYP-450 (Gráfica 1).

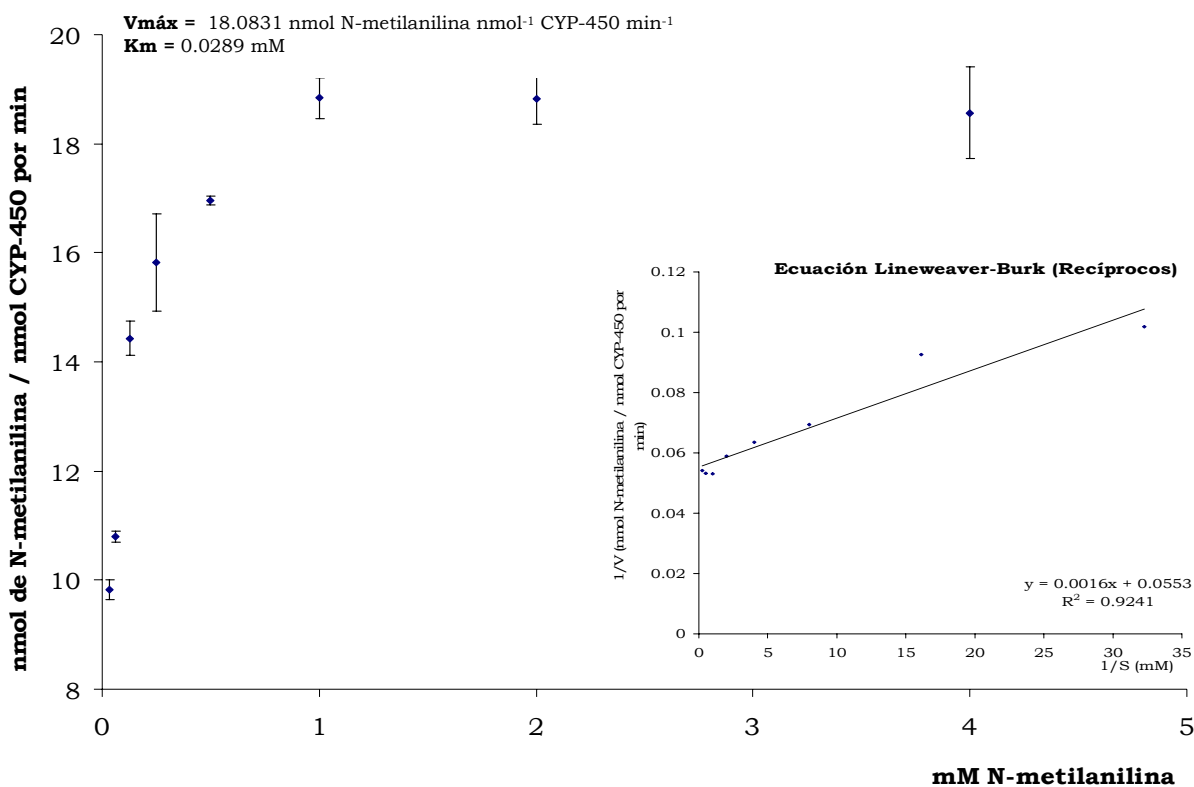


Gráfica 1. Actividad catalítica de CYP-450 utilizando anilina como sustrato. Concentraciones de anilina: 6.6x10⁻², 0.2, 0.6, 1.8, 5.4 mM e hidruro como donador de electrones.

6.3.2.2. ACTIVIDAD CATALÍTICA DEL CYP-450 EMPLEANDO H⁰ Y N-METILANILINA COMO SUSTRATO.

El sistema de reacción empleado para evaluar la formación de formaldehído y anilina utilizando N-metilanilina como sustrato fue el mismo sistema con el que se obtuvo la mayor conversión de anilina a *p*-aminofenol.

Es decir, el sistema en el cual NADP⁺® (Sigma) fue reducido con hidruro de silicio antes de ser añadido al sistema que contenía CYP-450 y N-metilanilina. Como se muestra en la Gráfica 2 el CYP-450 mantuvo actividad como N-desmetilasa.



Gráfica 2. Actividad catalítica de CYP-450 utilizando N-metilanilina como sustrato. Concentraciones 3.1×10^{-2} , 6.2×10^{-2} , 1.25×10^{-1} , 2.5×10^{-1} , 5×10^{-1} , 1, 2 y 4 mM e hidruro como donador de electrones.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de los resultados obtenidos de las reacciones de hidroxilación catalizadas por CYP-450 y probadas por dos diferentes sistemas reductores: NADPH[®] (Sigma) y NADP⁺ (Sigma) e hidruro de silicio.

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos de la hidroxilación de anilina por CYP-450 y dos sistemas reductores diferentes; NADPH[®] (Sigma) y NADP⁺ (Sigma) con hidruro de silicio.

	NADPH [®] (Sigma)	NADP ⁺ (Sigma) + H [⊖]
V _{máx} 1/V = nmol <i>p</i> -aminofenol nmol ⁻¹ CYP-450 min ⁻¹	0.0841	0.1352
K _m 1/S = mM	0.3571	0.2017

6.4. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN EL SISTEMA CYP-450, NADP⁺ (SIGMA), H[⊖] Y SUSTRATO UTILIZANDO RPE.

Se determinó el espectro RPE del CYP-450 contenido en los microsomas de hígado de conejo. La Figura 20A muestra una señal rómbica con un valor de $g_x = 2.3987$, $g_y = 2.2188$, $g_z = 1.8951$, los cuales son característicos del Fe⁺³ en bajo espín ($s=1/2$) para el CYP-450.

Cuando se adicionó hidruro de silicio al sistema de reacción la señal correspondiente al Fe⁺³ del CYP-450 no pudo ser observada, lo que indica que el hierro fue reducido a Fe⁺² (Figura 20B). Estos resultados concuerdan con los datos reportados, en donde el hidruro de silicio es capaz de reducir también el Fe⁺³ del citocromo *c* [57].

Se llevaron a cabo otras determinaciones utilizando el sistema de reacción compuesto por: CYP-450, NADP⁺ (Sigma), hidruro de silicio y anilina como sustrato. Esta medición se llevó a cabo después de haber iniciado la reacción (15 min). El espectro obtenido no mostró ninguna señal, lo que se

debe a que en la reacción, el Fe^{+3} es reducido a Fe^{+2} durante el ciclo catalítico (Figura 20C).

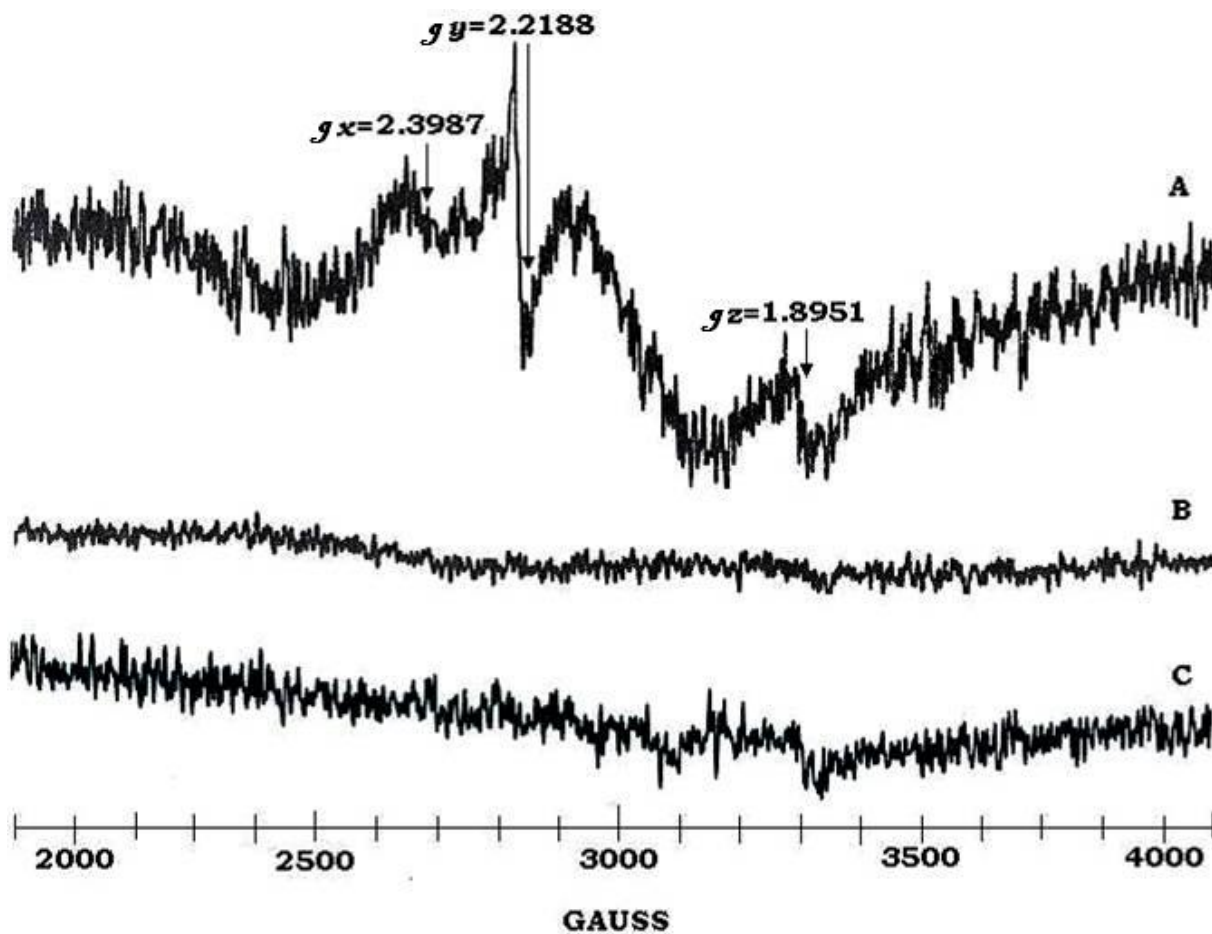


Figura 20. A) Espectros RPE que ilustran al CYP-450 (Fe^{+3}) de microsomas de hígado de conejo. B) CYP-450 reducido por el donador de electrones H^\ominus a Fe^{+2} . C) Sistema CYP-450, NADP⁺ (Sigma), H^\ominus y anilina. Condiciones: ganancia 2×1000 , potencia 25, tiempo 2 min.

7. DISCUSIÓN.

7.1. REDUCCIÓN DE NADP⁺® (SIGMA) POR HIDRURO DE SILICIO.

Los resultados muestran que el hidruro de silicio fue capaz de reducir el NADP⁺® (Sigma) a NADPH. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que el hidruro de silicio redujo el NAD⁺ a NADH [44]. Es importante mencionar que tanto el NAD⁺ como el NADP⁺ poseen un potencial de reducción similar (-0.320V) [58].

Se observó que la reacción redox (NADP⁺ + H[⊖] → NADPH) fue dependiente de la concentración del hidruro de silicio y del tiempo transcurrido posterior a su adición al sistema.

La reducción de NADP⁺® (Sigma) se evaluó utilizando diferentes concentraciones de hidruro de silicio: 2.9, 5.7, 11.4, 22.9 y 45.7 mg/mL, en la figura 18 A se muestra el espectro del UV-Visible que se obtuvo empleando una concentración de 5.7 mg/mL la cual fue empleada en las cinéticas.

Como se puede observar en la Figura 18B, la absorbancia a 340 nm aumenta con respecto al aumento en la concentración de hidruro de silicio, por lo tanto la concentración de hidruro (H[⊖]) es un factor importante en la reducción de NADP⁺® (Sigma), se observó que a una menor concentración de hidruro, 2.9 mg/mL, menor es la absorbancia a 340 nm y por lo tanto menor es la concentración de NADPH, sin embargo a una concentración de 45.7 mg/mL, la solución se satura y se dificulta su disolución.

También es evidente que cualquiera que fuera la concentración elegida para utilizar en los sistemas reductores de NADP⁺® (Sigma) hubiese sido

adecuada pues en comparación con el NADPH[®] (Sigma) la absorbancia a 340 nm esta por arriba de la obtenida por este sistema.

Para fines experimentales se seleccionó la concentración de 5.7 mg/mL, pues a pesar de que las concentraciones de 22.9 y 45.7 mg/mL de hidruro de silicio tienen la capacidad de reducir una gran cantidad de NADP⁺[®] (Sigma), no fue posible utilizarlas durante la experimentación por que la reacción del hidruro libera una gran cantidad de gas al inicio de la reacción. Además, con la máxima concentración el H[⊖] satura la solución y presenta características de insolubilidad. La concentración de 5.7 mg/mL, fue la mejor opción para llevar a cabo los experimentos, pues la cantidad de NADPH producido por las primeras dos concentraciones de entre el rango de 2.9 y 11.4 mg/mL, no aumenta considerablemente.

La reacción entre el NADP⁺[®] (Sigma) e hidruro de silicio también fue estudiada con respecto al tiempo: 0, 20 y 30 min. Así se comprobó que la máxima cantidad de no varía NADP⁺[®] (Sigma) es reducida después de 20 minutos de adicionado el hidruro de silicio al sistema. Después de 30 minutos de reposo, la cantidad de NADPH no varía en relación con la cantidad de NADP⁺[®] (Sigma) reducida a los 20 min. Además, a este tiempo de reposo el sistema es lo suficientemente estable (sin burbujeo).

Esta es la razón por la cual durante el trabajo experimental se preparó al sistema NADP⁺[®] (Sigma) e hidruro de silicio de manera independiente previo a ser adicionado a la reacción con CYP-450. El sistema NADP⁺[®] (Sigma) e hidruro de silicio se preparaba y agitaba por 30 minutos, lo que garantizaba la máxima liberación de iones hidruro (H[⊖]) y su estabilidad, evitando el burbujeo característico del inicio de la reacción.

Se ha reportado que cuando el hidruro de silicio es adicionado en solución su potencial de reducción inicial es de -0.322 V, pero que después de 23 minutos el potencial de reducción aumenta a -0.862 V [41], razón por la cual durante los experimentos no se observó un incremento en la cantidad de NADP⁺ reducido después de 30 minutos, esto debido a que el potencial de reducción del hidruro de silicio se mantiene y la liberación de iones hidruro (H[⊖]) es constante por periodos prolongados a un pH neutro.

Por esta razón el pH de la solución fue un factor importante en la liberación de los iones hidruro (H[⊖]) y por lo tanto en la capacidad reductora del hidruro de silicio [41, 57, 59]. Es importante mencionar que los experimentos se llevaron a cabo a pH controlado de 7.4.

7.2. ACTIVIDAD DEL CYP-450.

7.2.1. HIDROXILACIÓN CATALIZADA POR EL CYP-450 EMPLEANDO

ANILINA COMO SUSTRATO.

Los resultados de las cinéticas mostraron una menor transformación de anilina a *p*-aminofenol cuando en el sistema se utilizó directamente al hidruro de silicio y NADP⁺® (Sigma). Esto se debe al hecho de que el H[⊖] es capaz de reducir tanto al NADP⁺ como al átomo de hierro del grupo hemo, ya que el potencial de reducción estándar del CYP-450 es de -0.225 y 0.300 V, con y sin sustrato unido respectivamente [60, 61].

Por lo tanto, el potencial de reducción del CYP-450 es muy parecido al de NADP⁺. Además, la reducción del átomo de hierro del CYP-450 puede llevarse a cabo por el hidruro de silicio ya que la transferencia del primer electrón durante el ciclo catalítico del CYP-450 es independiente de la

interacción o no con la anilina, aunque muchos reportes han identificado que la unión del sustrato con el grupo hemo o la cercanía de la región distal del mismo, es factor determinante en la transferencia del primer electrón [62].

Por lo tanto, el hidruro de silicio disminuye la actividad catalítica del CYP-450 debido a que reduce el hierro del grupo hemo del CYP-450 y esto podría desfavorecer la capacidad de unión de la anilina con el Fe^{+2} [63].

Además, la actividad del CYP-450 puede verse disminuida ya que durante su ciclo catalítico se producen radicales libres los cuales podrían ser reducidos por el hidruro de silicio, ya que este compuesto tiene la capacidad de reducir a Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) [43, 60].

Para poder evitar la reducción del átomo de hierro en la reacción de hidroxilación de anilina a *p*-aminofenol se llevó a cabo la reducción de NADP^{+} ® (Sigma) con hidruro de silicio como un sistema independiente de la reacción principal del CYP-450. Con este sistema la enzima presenta mayor actividad que cuando el hidruro de silicio es adicionado a la reacción principal.

La Tabla 2, muestra el comparativo de los parámetros cinéticos de la reacción de hidroxilación de anilina por CYP-450 llevada a cabo por dos sistemas reductores diferentes NADPH ® (Sigma) y NADP^{+} ® (Sigma) e hidruro de silicio (H^{\ominus}). El valor de la $V_{\text{máx}}$ incrementa visiblemente en la reacción llevada a cabo experimentalmente con NADP^{+} ® (Sigma) e hidruro de silicio, mientras que el valor de K_m disminuye, esto explica como la enzima muestra mayor afinidad por el sustrato. La actividad catalítica del CYP-450 aumenta cuando se utiliza el sistema NADP^{+} ® (Sigma) e hidruro (H^{\ominus}) que con el sistema de NADPH ® (Sigma).

7.2.2. N-DESMETILACIÓN CATALIZADA POR EL CYP-450 EMPLEANDO

N-METILANILINA COMO SUSTRATO.

Dado que el sistema reductor CYP-450, NADP⁺® (Sigma) e hidruro tuvo actividad catalítica en la reacción de hidroxilación de anilina a *p*-aminofenol dicha actividad también fue evaluada utilizando N-metilanilina como sustrato para poder establecer su actividad como N-desmetilasa. (Gráfica 2).

Los resultados obtenidos de las cinéticas muestran la transformación de N-metilanilina a sus productos de reacción, utilizando el sistema donador de electrones que contiene NADP⁺® (Sigma) reducido con H[⊖].

Los resultados confirman que el hidruro de silicio es un sistema capaz de reducir al NADP⁺® (Sigma) a NADPH y ser la fuente donadora de electrones necesaria para la transformación del sustrato (N-metilanilina) a los productos de la reacción de N-desmetilación: formaldehído y anilina.

Con estos resultados el sistema CYP-450, NADP⁺® (Sigma) e H[⊖], demuestra tener actividad catalítica para reacciones en las que NADPH® (Sigma) puede ser sustituido por dicho sistema.

7.2.3. RESONANCIA PARAMAGNÉTICA DE ELECTRONES.

La reducción del átomo de hierro por hidruro de silicio fue corroborada por estudios de RPE. Primero, se determinaron los estudios de RPE a partir de la enzima, los cuales se muestran en la Figura 20A, donde se puede observar una señal rómbica a $g_x=2.3987$, $g_y= 2.2188$, $g_z=1.8951$, ésta es la característica del hierro en bajo espín (Fe⁺³, s=1/2) del CYP-450.

La señal no pudo ser observada posterior a la adición del hidruro de silicio, lo que indica que el hierro fue reducido a Fe^{+2} (Figura 20B) [57].

El espectro RPE del sistema CYP-450, NADP^{+} ® (Sigma), H^{\ominus} y anilina, no mostró ninguna señal, esto puede ser debido a durante la reacción el Fe^{+3} es reducido a Fe^{+2} (Figura 20C).

Además en éste último espectro no fue posible observar ninguna otra señal de algún otro aminoácido como tirosina o triptófano, pues ésta determinación se llevó a cabo utilizando nitrógeno en lugar de helio para llevar a cabo las determinaciones a temperatura variable.

8. CONCLUSIONES.

Obtenidos los microsomas y comprobada la existencia de la enzima CYP-450 se demostró la actividad catalítica de dicha enzima como monooxigenasa y N-desmetilasa *in vitro*, empleando para este fin un nuevo sistema generador de NADPH con hidruro de silicio.

Calculada y establecida la concentración óptima de hidruro de silicio en la cual una mayor cantidad de NADP⁺® (Sigma) es reducido a NADPH, ésta fue aprovechada para llevar a cabo la reducción de NADP⁺® (Sigma) durante el proceso catalítico del CYP-450. Aunque, también se comprobó que la actividad del CYP-450 es mejor cuando se lleva a cabo la reducción independiente de la reacción, esto es porque el hidruro de silicio también es capaz de reducir al átomo de hierro del CYP-450.

Cabe mencionar que la actividad de la enzima fue mucho mayor utilizando al sistema NADP⁺ reducido con hidruro de silicio que utilizando NADPH® (Sigma).

La transferencia de electrones del H⁰ al CYP-450 fue corroborada por RPE, donde la señal rómbica característica del Fe⁺³ no fue observada después de la adición del hidruro de silicio.

Las aplicaciones más evidentes del sistema NADP⁺® (Sigma) e hidruro de silicio se resumen en que éste es un sistema sencillo de preparar, económico, eficiente y puede ser considerado como una nueva opción para evaluar la biotransformación de muchos xenobióticos (fármacos), en comparación con otros métodos tradicionales, como lo es sistema de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

9. REFERENCIAS.

1. P.R. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, 2nd ed., Plenum Press (1995), New York.
2. F.P. Guengerich A.D. Vaz, G.N. Raner, S.J. Pernecky, M.J. Coon, *Evidence for a Role of a Perferryl-Oxygen Complex, FeO³⁺, in the N-Oxygenation of Amines by Cytochrome P450 Enzymes*, *Mol Pharmacol.*, 51(1997):147-151.
3. J.B. Schenkman, I. Jansson, *The many roles of cytochrome b₅*, *Pharmacol Ther.*, 97 (2003):139-152.
4. F.P. Guengerich, *Cytochrome P450 enzymes. In Biotransformation, comprehensive toxicology*, Elsevier Science, Oxford (1997):37-68.
5. M. Taylor, D.C. Lamb, R.J. Cannell, M.J. Dawson, S.L. Kelly, *Cofactor recycling with immobilized heterologous cytochrome P450 105D1 (CYP105D1)*, *Biochem Biophys Res Commun.*, 279(2000):708-711.
6. J. Axelrod, *The enzymatic demethylation of ephidrine*, *J. Pharma.*, 114: 430, 1955.
7. B. Brodie, J. Axelrod, J.R. Copper, L. Gaudette, *Detoxycation of drugs and other foreing compounds by liver microsomes*, *Science*, 21(1955):603.
8. M. Klingenberg, *Pigments of rat liver microsomes*, *Arch Biochem Biophys.*, 75(1958):376.
9. T. Omura, R. Sato, *The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature*, *J Biol Chem.*, 239(1964):2370.
10. T. Omura, R. Sato, *The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. Solubilization, purification and propertie*, *J Biol Chem.*, 239(1964):2379.
11. Y. Imai, R. Sato, *Evidence for two forms of P450 hemoprotein in hepatic microsomal membranes*, *Biochem Biophys Res Commun.*, 23(1966):5.

12. S. Arasimhulu, D.Y. Cooper, O. Rosenthal, *Spectrophotometric properties of a trtoclarified steroid 21 hidroxylase of adrenocortical microsomes*, Life Sci., 4(1965):2101.
13. H. Remmer, J. Schenkman, R.W. Estrabrook, H. Sasame, J. Grette, S. Narasimhulu, D.Y. Cooper, O. Rosenthal, *Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome*, Mol Pharmacol., 2(1966):187.
14. J.B. Schenkam, H. Remmer, R.W. Estrabook, *Spectral studies of drug interactions with hepatic microsomal cytochrome*, Mol Pharmacol., 3(1967): 113.
15. Y. Imai, R. Sato, *Substrate interaction with hydroxylase sistem in liver microsomes*, Biochem Biophys Res Commun., 22(1966):620.
16. W. Cammer, J.B. Schenkman, R.W. Estrabrook, *Measurments of substrate interaction with cytochrome P-450*, Biochem Biophys Res Commun., 23(1966):264.
17. Y.F. Kuriyama, Y.M. Kami, K. Kawajiri, K. Sogawa, M. Muramatsu, *Primary structure of a cytochrome P450 coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible*, Proc Natl Acad Sci., 79(1982):2793.
18. K. Kawajiri, O. Gotoh, K. Sogawa, Y. Tagashira, M. Muramatsu, Y.F. Kuriyama, *Coding nucleotide sequence of 3-methylcholantrene inducible cytochrome P450 cDNA from rat liver*, Proc Natl Acad Sci., 81(1984):1649.
19. Devlin TM. "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations." New York: Wiley-Liss, (1997):982.
20. D.R. Nelson, T. Kamataki, D.J. Waxman, F.P. Guengerich, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, F.J. Gonzalez, M.J. Coon, I.C. Gunsales, O. Gotoh, K. Okuda, D.W. Nebert, *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping accesion numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature DNA*, DNA Cell Biol., 12(1993):1.

21. M. Komori, A. Higami, Y. Imai, S. Imaoka, Y. Funae, *Purification and characterization of a form of P450 from horse liver microsomes*, J Biochem., 114(1993):445.
22. S.D. Nelson, P.J. Harvinson, F.P. Guengerich, *Roles of cytochromes P450 in chemically induced cytotoxicity in mammalian Cytochromes P-450*, Ed. CRC Press, Vol. 2 (1987) Chap. 2.
23. S.S. Lau, T.J. Monks, J.R. Gillette, *Multiple reactive metabolites derived from bromobenzene*, Drug Metab Dispos., 12(1984):291.
24. R. Jover, X. Ponsoda, J.L. Gomez, J.V. Castell, *Cocaine hepatotoxicity: two different toxicity mechanisms for phenobarbital-induced and non induced rat hepatocytes*, Biochem Pharmacol., 46(1993):1967.
25. U.A Boelsteril, A. Lanzotti, C. Goldlin, M. Oertle, *Identification of cytochrome P450 IIB1 as a cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured rat hepatocytes*, Drug Metab Dispos., 20 (1992):96.
26. T. Kamataki, R.A. Neal, *Metabolism of diethyl-p-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) by a reconstituted mixed-function oxidase enzyme system: studies of the covalent binding of the sulfur atom*, Mol Pharmacol., 12(1976):933.
27. D.R. Koop, *Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450, isozyme 3A*. Mol Pharmacol, 29(1986):399–404.
28. E. Bayer, H.A.O. Hill, A. Roder, R.J.P. Williams, *The interaction between haem-iron and thiols*, Chem Commun., 109(1969).
29. T.L. Poulos, B.C. Finzel, A.J. Howard, *Crystal structure of substrate free pseudomonas putida cytochrome*, Biochemistry, 25(1986):5314.
30. J.T. Groves, Y. Watanabe, *Reactive iron porphyrin derivatives related the catalytic cycles of cytochrome P450 and peroxidase studies of oxigen activation*, J Am Chem Soc., 110(1988):8433.

- 31.** R.E. White, M.J. Coon, *Oxygen Activation by cytochrome P-450*, *Annu Rev Biochem.*, 49(1980):315.
- 32.** T. Egawa, T. Ogura, R. Makino, T. Kitagawa, *Observation of O-O stretching raman band for cytochrome P-450 cam under catalytic conditions*, *J Biol Chem.*, 266(1991):10246.
- 33.** F.P. Guengerich, *Enzymatic oxidations of xenobiotic chemicals*, *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 25(1990):97.
- 34.** F.P. Guengerich, *Cytochrome P450 enzymes*, *American Scientist*, 81(21993):440.
- 35.** W. Lilienblum, K.L. Platt, G. Schirmer, F. Oesch, K.W. Bock, *Regioselectivity of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward phenols of benzo(a)pyrene and dibenz(a)anthracene*, *Mol Pharmacol.*, 32(1987):173.
- 36.** M. Murray, G.F. Reidy, *Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P450 by chemical agents*, *Pharmacol Rev.*, 45 (1990): 85.
- 37.** R.W. Estabrook, J. Werringloer, V. Lirich, A. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney, *Microsomes and Drug Oxidations*, Pergamon Press, Oxford (1977):748.
- 38.** A.R. Goepfert, H. Scheerens, N.P.E. Vermeulen, *Oxygen and xenobiotics reductase activities of cytochrome P-450*, *Crit Rev Toxicol.*, 25 (1995): 25.
- 39.** M. Sundberg, A.I. Hagbjork, *On the significance of the cytochrome P450 dependent hidroxyl radical mediated oxigenation mechanism*, *Xenobotica*, 12(1982):673.
- 40.** T.F. Slater, B.C. Sawyer, *The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro: general features of the systems used*, *Biochem J.*, 123(1971):805–814.

41. C. Stephanson, G. Flanagan, *Non-toxic hydride energy source for biochemical and industrial venues: ORP and NAD*, Int J Hydrogen Energy, 29(2004):459 – 464.
42. C. Stephanson, G. Flanagan, *Synthesis of a novel anionic hydride organosiloxane presenting biochemical properties*, Int J Hydrogen Energy, 28(2003):1243 – 1250.
43. C. Stephanson, G. Flanagan, *Evaluation of Hydroxyl Radical-Scavenging Abilities of Silica Hydride, Antioxidant Compound, by a Fe²⁺-EDTA-Induced 2-Hydroxyterephthalate Fluorometric Analysis*, J Med Food, 3(2003):249–253.
44. C. Stephanson, G. Flanagan, *Differential Metabolic Effects on Mitochondria by Silica Hydride Using Capillary Electrophoresis*, J Med Food, 7(2004):79–83.
45. E.K. Zavoisky, *Paramagnetic relaxation of liquid solutions for perpendicular fields*, J. Phys., 9(1945):211-217.
46. J. Frenkel, *On the Theory of Relaxation Losses, Connected with Magnetic Resonance in Solid Bodies*, J. Phys., 9(1945):299-304.
47. E.M. Purcell, H.C. Torrey, R.V. Pound, *Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid*, Phys Rev., 69(1946):37.
48. F. Bloch, H. and M. Packard, *The nuclear induction experiment*, Phys. Rev., 70(1946):474.
49. F. Bloch, *Nuclear Induction*, Phys. Rev., 70(1946):460.
50. M. Taylor, D. C. Lamb, R. J. P. Cannell, M. J. Dawson, S. L. Kelly, *Cofactor recycling with immobilized heterologous cytochrome P450 105D1 (CYP105D1)*, Biochem Biophys Res Commun., 279(2000):708-711.
51. M. Manno, S. Cazzaro, M. Rezzadore, *The mechanism of the suicidal reductive inactivation of microsomal cytochrome P450 by halotane*, Arch Toxicol., 65(1990):191.

52. D.W. Nebert, M. Negishi, *Multiple forms of cytochrome P-450 and the importance of molecular biology and evolution*, *Biochem Pharmacol.*, 15(1982):2311–2317.
53. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randal, *Protein measurement with the folin phenol reagent*, *J Biol Chem.*, 193(1951):265.
54. T. Nash, *The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction*, *Biochem J.*, 55 (1953):416–421.
55. P. Hildebrandt, H. Garda, A. Stier, G.I. Bachmanova, I.P. Kanaeva, A.I. Archakov, *Protein-protein interactions in microsomal cytochrome P-450 isozyme LM2 and their effect on substrate binding*, *Eur J Biochem.*, 186(1989):383–388.
56. I.P. Kanaeva, R. Dedinskii, E.D. Skoselyas, A.G. Krainev, I.V. Guleva, I.F. Sevryukova, Y.M. Koen, G.P. Kuznetsova, B.I. Bachmanova, A.I. Archakov, *Comparative study of monomeric reconstituted and membrane microsomal monooxygenase systems of the rabbit liver. I: Properties of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 LM[2] (2B4) monomers*, *Arch Biochem Biophys.*, 298(1992):395-402.
57. C.J. Stephanson, G.P. Flanagan, *Antioxidant capacity of silica hydride: A combinational and fluorescence detection assay*, *Free Radic Biol Med.*, 35(2003):1129-1137.
58. C.K. Mathews, K.E. Van Holde, K.G. Ahern, *Biochemistry*, 3th ed. San. Francisco: Addison Wesley Longman; (1999).
59. M. Clark, B. Cohen, *Studies of oxidation-reduction: II. An analysis of the relations between reduction potential and pH*, *Public Health Rep.*, 38(1923):666–683.
60. F.P. Guengerich, *Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity*, *Chem Res Toxicol.*, 14(2001):611-650.

61. I.F. Sevrioukova, L. Huiying, Z. Hong, J.A. Peterson, T.L. Poulos, *Biochemistry Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex (cytochrome P450 reductase, flavodoxin / protein-protein interaction)*, Natl Acad Sci., 96(1999):1863-1868.
62. D.E. Colburn, F.J. Giles, D. Oladovich, J.A. Smith, *In vitro evaluation of cytochrome P450-mediated drug interactions between cytarabine, idarubicin, itraconazole and caspofungin*, Hematology, 9(2004):217-221.
63. J.P. Evans, K. Ahn, J.P. Klinman, *Evidence that Dioxygen and Substrate Activation are Tightly Coupled in D β M: Implications for Oxygen Activation*, J Biol Chem., 278(2003):49691-49698.
64. A. A. Manenkov, *The role of electron paramagnetic resonance in the development of quantum electronics: facts and comments*, PHYS-USP, 49(2006):645-649.
65. P. M. Lenahan, J. F. Conley, Jr., *What can electron paramagnetic resonance tell us about the Si/SiO₂ system?*, J of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures, 16(1998):2134-2153.
66. M. Bennati, *New developments in high field electron paramagnetic resonance with applications in structural biology*, Rep. Prog. Phys., 68(2005):411-448.
67. A.H. Phillips, R.G. Langdon, *Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: Isolation, characterization, and kinetic studies*, J Biol Chem, 237(1962):2652-2660.

9.1. REFERENCIAS WEB.

- I.** http://www.uv.es/jcastell/Citocromo_P450.pdf
- II.** <http://www.monografias.com/trabajos34/hidrogeno/hidrogeno.shtml>
- III.** <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node50.html>
- IV.** http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm
- V.** <http://www.physik.fu-berlin.de/~ag-kuch/FMR.html>
- VI.** <http://www.laprevencion.com/prevencion/b26/c5/d2/e5/index.html>
- VII.** http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/The_Americas/United_States.html. *PARA LA OBTENCIÓN DE ESTOS COSTOS SE CONSIDERÓ EL TIPO DE CAMBIO DEL DÍA 11 DE AGOSTO DE 2007 (\$11.0115 PESOS/DÓLAR), ASÍ COMO EL PRECIO DE LOS REACTIVOS REPORTADOS EN EL CATÁLOGO DEL PROVEEDOR.

10. ANEXOS.

10.1. ARTÍCULO SOMETIDO A REVISIÓN.

CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P-450 USING NADPH REDUCED BY SILICA HYDRIDE

Rosales Hernández M.C.^{a,*}, Ortiz Pérez S. S.^{a,c}, Aceves J. M.^c, Correa-Basurto J.^{a,b}, Ramírez Rosales D.^d, Zamorano Ulloa R.^d, Trujillo Ferrara J.^a

^a Sección de Estudios de Postgrado e Investigación, Departamento de Bioquímica y ^b Departamento de Farmacología de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, 11340, México, D.F.

^c Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán-UNAM, Departamento de Química, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 74540, México.

^d Departamento de Física, ESFM, IPN, Ave. Instituto Politécnico Nacional s/n, Edif. 9 U.P. Zacatenco, Col. San Pedro Zacatenco, 07738, México, D.F.

*Corresponding author

Phone (55) 57296000 ext 46261

Fax (55) 57296000 ext 62806

e-mail: marcrh2002 yahoo.com.mx

CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P-450 USING NADPH REDUCED BY SILICA HYDRIDE

Rosales Hernández M.C.^{a,*}, Ortiz Pérez S. S.^{a,c}, Aceves J. M.^c, Correa-Basurto J.^{a,b}, Ramírez Rosales D.^d, Zamorano Ulloa R.^d, and Trujillo Ferrara J.^a ^aSección de Estudios de Posgrado e Investigación, Departamento de Bioquímica y ^bDepartamento de Farmacología de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, 11340 México, D.F. ^c Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán-UNAM, Departamento de Química, Av. 1 de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 74540, México., ^dDepartamento de Física, ESFM, IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Edif. 9 U.P. Zacatenco, Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F. 07738, México.

Abstract.

Cytochrome P-450 (CYP450) group is important during the drug metabolism due to that catalyze several kinds of reactions. However, it has several limitations, the main one is the use of the cofactor (NADPH) for *in vitro* assays. In this work the catalytic activity of CYP450 was evaluated using NADP⁺ reduced with silica hydride which acts as an electron donator. The results showed that the reduction of NADP⁺ with silica hydride was concentration and time-dependent. In addition, CYP450 mantained its activity when NADP⁺ and silica hydride were added during the reaction. However, its activity was the best when NADP⁺ was reduced before being added to the reaction system and also when NADPH was used. The CYP450 activity decrease with the first system is due to the fact that silica hydride is able to reduce NADP⁺ and the iron atom from CYP450 simultaneously, avoiding or diminishing the aniline affinity by the active site. The iron atom reduction with silica hydride was corroborated by electronic paramagnetic resonance (EPR). It is worthnoting that the use of NADP⁺ reduced with silica hydride is a good system for studying biotransformation reactions at less cost.

Keywords: Cytochrome P450, Drug metabolism; Electron paramagnetic resonance; Silica hydride, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

10.2. EXPERIMENTAL BIOLOGY MEETING 2007.

(THE FASEB JOURNAL, EBM 2007)

http://www.fasebj.org/cgi/gca?SEARCHID=1&AUTHOR1=Rosales&VOLUME=21&FIRSTIND EX=0&hits=10&RESULTFORMAT=&gca=21%2F5%2FA670&sendit=Get+All+Checked+Abstra ct%28s%29

The screenshot shows a web browser window displaying the FASEB Journal website. The address bar shows the URL: http://www.fasebj.org/cgi/gca?SEARCHID=1&AUTHOR1=Rosales&VOLUME=21&FIRSTIND EX=0&hits=10&RESULTFORMAT=&gca=21%2F5%2FA670&sendit=Get+All+Checked+Abstra ct%28s%29. The page header includes the FASEB Journal logo and navigation links: HOME, HELP, FEEDBACK, SUBSCRIPTIONS, ARCHIVE, SEARCH, and SEARCH RESULT. A search box is visible with the author name 'Rosales' entered. The main content area displays 'Selected Abstracts' with a return count of 1. The abstract title is 'CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P-450 USING NADP+ REDUCED BY SILICA HYDRIDE' by martha cecilia rosales hernandez, sandra selene Ortiz Pérez, Jose manuel Aceves, Jose Correa Basurto, Daniel Ramirez Rosales, Rafael Zamorano Ulloa, and Jose Trujillo Ferrara. The abstract text describes the catalytic activity of P450 using NADP+ reduced with silica hydride, comparing it to NADPH. The abstract concludes that the use of NADP+ reduced with silica hydride is a good system for studying biotransformation reactions. The footer includes the copyright notice: Copyright © 2007 by The Federation of American Societies for Experimental Biology.

Dirección <http://www.fasebj.org/cgi/gca?SEARCHID=1&AUTHOR1=Rosales&VOLUME=21&FIRSTIND EX=0&hits=10&RESULTFORMAT=&gca=21%2F5%2FA670&sendit=Get+All+Checked+Abstra ct%28s%29> Ir Vínculos » Norton AntiVirus

The FASEB Journal U.S./M.L. Facilities Capacity Columbus Instruments www.colinst.com 800-221-2375

HOME HELP FEEDBACK SUBSCRIPTIONS ARCHIVE SEARCH SEARCH RESULT

QUICK SEARCH: [advanced]
Author: Rosales Keyword(s):
Go Year: Vol: 21 Page:

Selected Abstracts [Download ALL Selected Citations to Citation Manager](#)

Returned: 1 citations and abstracts. Click on down arrow or scroll to see abstracts.

martha cecilia rosales hernandez, sandra selene Ortiz Pérez, Jose manuel Aceves, Jose Correa Basurto, Daniel Ramirez Rosales, Rafael Zamorano Ulloa, and Jose Trujillo Ferrara
CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P-450 USING NADP+ REDUCED BY SILICA HYDRIDE
FASEB J. 21: 669.2

Abstract 1 of 1

669.2

CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P-450 USING NADP+ REDUCED BY SILICA HYDRIDE

martha cecilia rosales hernandez¹, sandra selene Ortiz Pérez³, Jose manuel Aceves³, Jose Correa Basurto², Daniel Ramirez Rosales⁴, Rafael Zamorano Ulloa⁴ and Jose Trujillo Ferrara⁵

¹ Bioquímica,
² Farmacología, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, México, D.F., México, D.F., 11340, Mexico,
³ Departamento de Química, Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán-UNAM, av. 1 de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México., México, 74540, Mexico,
⁴ Departamento de Física, Instituto Politécnico nacional ESFM, Ave. Instituto Politécnico Nacional S/N, Edif. 9 U.P. Zacatenco, Col. San pedro Zacatenco., México, 07738, Mexico,
⁵ Bioquímica, Instituto Politécnico Nacional, ESM, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, México, D.F., México, D.F., 11340, Mexico

ABSTRACT

Cytochrome P-450 (P450)enzymes play an important role during the drug metabolism due to it catalyzes a great amounting of reactions. However, their use for in vitro assays has several limitations, the main one is the use of the cofactor (NADPH). In this work the catalytic activity of P450 using NADP+ reduced with silica hydride was evaluated. The results obtained showed that the reduction of NADP+ with silica hydride was concentration and time-dependent. In addition, P450 maintained its activity when NADP+ and silica hydride were added during the reaction, however its activity was less than when NADPH was employed. It is due to the fact that silica hydride is able to reduce not only to NADP+ but also to iron atom from P450, avoiding or diminishing the aniline affinity by the active site. The reduction of the iron atom with silica hydride was corroborated by electronic paramagnetic resonance (EPR). On the other hand, when NADP+ was reduced with silica hydride before being added to the reaction, the P450 activity was better than when NADPH was used. Therefore, it is worthnoting that the use of NADP+ reduced with silica hydride before to be added to the reaction could be a good system for studying biotransformation reactions.

HOME HELP FEEDBACK SUBSCRIPTIONS ARCHIVE SEARCH SEARCH RESULT

Copyright © 2007 by The Federation of American Societies for Experimental Biology.

JOURNAL COVER (THE FASEB JOURNAL, EBM 2007)

The FASEB Journal

The New Biology: Reports, Reviews, and FJ Express

Experimental Biology 2007®

**Washington, DC
April 28 – May 2, 2007**

ABSTRACTS PART I

Abstracts 8.1 – 701.35

**April 2007
Vol. 21, No. 5**

CERTIFICATE OF ATTENDANCE TO THE EXPERIMENTAL BIOLOGY MEETING 2007


2007

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certifies that the following person participated and attended the Experimental Biology (EB) Meeting at the Washington Convention Center in Washington, DC over the dates of April 28 – May 2.

Name: Martha Cecilia Rosales Hernández
Affiliation: Escuela Superior de Medicina IPN
Session Title: Cytochrome P-450
Session/Board Number: 669.2
Date of Session: April 30
Time of Session: 12:15 - 13:15


Pauline Minhinnett, CMP, Meeting Manager
FASEB-Scientific Meetings & Conferences

COPY OF THE POSTER ABSTRACT (THE FASEB JOURNAL, EBM 2007)

669.2

CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P-450 USING NADP⁺ REDUCED BY SILICA HYDRIDE

martha cecilia rosales hernandez¹, sandra selene ortiz pérez², jose manuel aceves³, jose correa basurto², daniel ramírez rosales⁴, rafael zamorano ulloa⁴, jose trujillo ferrara⁵. ¹Bioquímica, ²Farmacología, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, México, D.F., México, D.F., 11340, México. ³Departamento de Química, Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán-UNAM, av. 1 de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México., México, 74540, México. ⁴Departamento de Física, Instituto Politécnico nacional ESFM, Ave. Instituto Politécnico Nacional S/N, Edif. 9 U.P. Zacatenco, Col. San pedro Zacatenco., México, 07738, México. ⁵Bioquímica, Instituto Politécnico Nacional, ESM, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, México, D.F., México, D.F., 11340, México.

Cytochrome P-450 (P450)enzymes play an important role during the drug metabolism due to it catalyzes a great amount of reactions. However, their use for in vitro assays has several limitations, the main one is the use of the cofactor (NADPH). In this work the catalytic activity of P450 using NADP⁺ reduced with silica hydride was evaluated. The results obtained showed that the reduction of NADP⁺ with silica hydride was concentration and time-dependent. In addition, P450 maintained its activity when NADP⁺ and silica hydride were added during the reaction, however its activity was less than when NADPH was employed. It is due to the fact that silica hydride is able to reduce not only to NADP⁺ but also to iron atom from P450, avoiding or diminishing the aniline affinity by the active site. The reduction of the iron atom with silica hydride was corroborated by electronic paramagnetic resonance (EPR). On the other hand, when NADP⁺ was reduced with silica hydride before being added to the reaction, the P450 activity was better than when NADPH was used. Therefore, it is worth noting that the use of NADP⁺ reduced with silica hydride before to be added to the reaction could be a good system for studying biotransformation reactions.

COPY OF THE AUTHOR INDEX (THE FASEB JOURNAL, EBM 2007)

Author Index

- Nurkiewicz, T.R., 5144, 741.1, 903.4
 Nurse, C.A., 737.19, 762.3, 762.9
 Nusrat, A., 5123, 5312, 382.6, 382.8, 382.9, 382.10, 617.5, 711.5
 Nussenweig, A., 36.3, 774.8
 Nutanson, I., 709.3
 Nuttall, A.L., 593.2, 874.1
 Nwensika, C.V., 355.6, 859.8
 Nyberg, M., 905.21
 Nye, H.L.D., 324.8
 Nygaard, E., 774.16
 Nygaard, H., 965.31
 Nyquist, J.A., 476.6
 Nytop, J.E., 367.4, 534.4
 Nytorriak, M.A., 960.13
 Nystrom, G., 855.17, 949.5
- O**
- O, W.S., 480.3
 O'Neill, A., 805.15
 Oakes, M., 353.2
 Oakes, R.A., 908.23
 Oates, B.R., 768.6, 769.24, 895.11
 Oba, M., 839.6
 Obad, A., 952.2, 952.3, 952.4, 952.5
 Obajimi, O., 824.1
 O'Bannon, M.K., 5379
 Obata, K., 796.10
 Obayashi, S., 527.10
 Obeld, L.M., 73.1
 Obenaus, A., 557.10
 Oberg, K.C., 437.4, 440.5, 481.7
 Oberlas, D., 697.13
 Oberlöhner, H., 585.4
 Oberley, L.W., 74.1
 Oberoi, L.M., 950.4
 Oberpenning, F., 320.1
 Ober, K., 350.5
 Obertone, T.S., 617.19
 Obicichina, A., 755.20
 Obidi, P., 584.4
 Obirok, A.K., 350.6
 Obregon, D., 883.9
 O'Brien, J., 896.10, 896.11
 O'Brien, K., 858.9
 O'Brien, K.D., 546.7
 O'Brien, M., 8.3
 O'Brien, R., 40.5
 O'Brien, Jr., W.D., 549.1
 Obronova, I.G., 893.16, 912.4
 O'Callaghan, B.L., 5445, 824.2
 Ocarrieta, M.P., 797.6
 Ochoa, C.D., 978.1, 978.2
 Ochoa, E.R., 125.12
 Ochi, E.S., 667.12
 Ock, M.C., 104.2
 O'Connell, B., 346.2
 O'Connell, J., 701.3
 O'Connor, D.H., 866.10
 O'Connor, D.L., 241.8, 701.2
 O'Connor, D.T., 568.3
 O'Connor, E., 8430, 478.20
 O'Connor, P.M., 382.4, 578.9, 711.19
 O'Connor, R., 5172, 610.11
 O'Connor, R.E., 611.14
 O'Connor, S., 866.10
 Oddy, W., 5221
 O'Dea, S., 493.4
 O'Dell, K., 648.6
 Odetti, P., 41.18
 Odgaard, E., 5421, 937.1
 O'Donnell, C.J., 366.4
 O'Donnell, J., 718.3
 O'Donnell, J.A., 374.10
 O'Donnell, J.C., 883.1
 O'Donnell, M., 604.16
 O'Donnell, R., 668.2
 Oe, T., 903.27
 Oganesian, A., 866.1
 Ogata, K., 41.10
 Ogawa, J.-I., 636.1
 Ogay, V., 623.1
 Ogborna, E.I., 883.7
 Ogborn, M.R., 224.1
 Ogden, C., 360.2
 Ogden, K.K., 905.2
 Ogletree, M.L., 908.38
 Ogi, S., 614.23, 614.25, 957.15
 O'Grady, S.M., 5173, 5180, 772.15, 773.4, 872.3
 Ogru, E., 552.1
 Ogunfipe, O., 890.1
 Ogunlana, L.A., 744.2
 Ogunshola, O., 741.8, 749.1
 Ogunyankin, K., 899.29
 Ogunyankin, K.O., 908.21
 Oh, B.S., 868.13
 Oh, E., 40.7
 Oh, H., 862.9
 Oh, H.-J., 870.11
 Oh, H.Y., 848.9
 Oh, K., 704.12
 Oh, K.-S., 834.7
 Oh, S.H., 842.1
 Oh, S.P., 5385
 Oh, S.-Y., 702.3
 Oh, T.-K., 649.8
 Oh, Y.-S., 779.11
 O'Handley, S.F., 792.1, 792.8
 Ohba, K., 354.2
 Ohba, T., 625.5
 Ohia, S.E., 884.2
 Ohkawara, H., 373.9
 Ohki, S.-y., 599.15
 Ohmura, S., 721.9
 Ohshima, K., 556.4
 Ohya, H., 636.1
 Ohya, T., 632.4
 Ohyanagi, M., 890.13
 Ohno, H., 905.27, 905.28, 905.29
 Ohno, M., 599.13
 Ohno, T., 816.2
 Ohno, T.C., 600.8, 969.1, 969.10, 969.16
 Ohno, N.B., 5473, 972.3, 972.4
 Oka, S., 650.7
 Okah, A.B., 933.8
 Okada, Y., 614.11
 Okamura, K., 539.1, 615.19
 Okar, D.A., 805.4
 Okazaki, K., 614.11, 750.18, 750.20, 903.4, 919.2, 957.5
 O'Keefe, E., 586.2
 Okoko, J.C., 550.1
 Okoro, I.C., 753.7
 Okita, T.W., 806.1, 806.2
 Okische, A., 568.11
 Oku, K., 732.24
 Oku, M., 732.24
 Okuda, Y., 194.5
 Okuhara, D., 79.1
 Okumura, K., 603.10
 Okumura, M., 762.17
 Okumura, S., 737.24
 Okuyajyige, F.M., 802.2
 Okuyajyige, F.M., 973.8
 Okuyeni, A., 582.50
 Oldham, K.T., 373.3
 Oldham, W.M., 590, 631.1, 892.6
 Oleary, D.S., 582.15, 582.16, 613.11, 910.15
 O'Leary, M.F.N., 5300, 767.5
 O'Leary, T.J., 8258
 Oliveira, C.R., 126.5, 126.6
 Oliveira, I.B., 755.23, 973.14
 Oliveira, J.A.C., 878.1
 Oliveira, P.F., 849.3, 849.4
 Oliveira-Felleggrin, G.R., 962.1
 Oliveira-Sales, E.B., 598.7, 618.6, 750.8, 892.9
 Oliver, C.J., 372.7
 Oliver, G., 5124, 5363
 Oliver, J.M., 374.6
 Oliver III, R.E., 554.7, 970.3, 970.4
 Oliver, S.E., 769.13, 907.5
 Olivier, N.B., 908.18
 Olivieri, M.P., 966.4
 Ollinger, F., 548.8
 Olney, D.K., 674.5
 Olney, J.W., 5388
 Olsen, L.W., 359.8
 Olsen, O., 605.14
 Olson, A., 680.7
 Olson, C.M., 353.5
 Olson, E.B., 733.12
 Olson, Jr., E.B., 918.20
 Olson, E.N., 905.3
 Olson, E.R., 976.3
 Olson, J., 483.3
 Olson, J.E., 732.36
 Olson, J.J., 47.4
 Olson, R.D., 616.10
 Olson, S., 978.4
 Olson, T.R., 477.11
 Olsson, L., 196.2
 Olsson, R., 721.9
 Olthaus, D.S., 5421, 5962.1
 Olthaus, C.L., 893.2
 O'Malley, P., 453.1
 Omalu, B.I., 560.6
 O'Mara, D., 817.1
 Omer, N.E., 5206, 670.1
 Omiecinski, C.J., 8274, 5461, 567.9, 574.10, 886.17
 Omolowa-Tomohi, G., 536.5
 Omotade, O., 532.4
 O'Neill, C., 980.2
 O'Neill, R.G., 945.2, 968.5
 O'Neill, B.P., 47.11
 O'Neill, J.T., 917.11
 Onken, K.L., 832.11
 Ono, T., 650.7
 Ono, Y., 650.2
 Ononwu, I.M., 909.1
 Onni-Criszbeck, L., 828.2
 Onyiah, H., 571.13
 Ooi, L., 657.2
 Oosterhouse, E.J., 807.15
 Oosterveid-Hut, R., 5173, 606.13
 Opaszky, C., 918.4
 Oparil, S., 743.4
 Operana, T.N., 888.6
 Opere, C.A., 884.2
 Opp, M.R., 962.8
 Oppenheimer, S.B., 498.1, 498.2, 872.11, 872.12, 872.13
 Opperman, L., 315.3
 Opperman, M., 595.28
 Oppong, Y., 895.8
 Opatz, G., 351.7
 Orlovsk, J.M., 366.4
 Orsa, V., 750.26
 O'Reilly, K.C., 885.7
 Orrellana, R.A., 354.6, 539.20, 694.4, 860.2
 Orren, J.M., 5172, 5172, 610.9, 610.11, 918.29
 Orfeo, T., 643.2
 Organ, J.M., 624.2
 Organista, A., 962.2
 Orzol, E., 534.9
 Orzoco, M., 723.7
 Orzandi, S., 250.2
 Orzando, R.C., 711.6
 Orzol, S.N., 603.2
 Orzova, V., 363.3, 248.5, 375.12
 Orszabec, M.J., 615.23
 Orsvold, E., 559.1
 Orszag, Z., 5431, 576.2, 577.15, 577.16, 743.5, 904.3
 O'Rourke, J., 383.9
 O'Rourke, M., 619.1
 O'Rourke, S.T., 571.5
 Orzoco, E., 814.9
 Orzoco, M.N., 365.6
 Orr, A.W., 892, 506.6, 506.8
 Orr, J.A., 956.6, 968.12
 Orry, A., 650.9, 806.6
 Ort, T., 615.7
 Ortega Blake, I., 574.1
 Ortega, J.D., 498.2
 Ortega, M.I., 531.8
 Ortiz, H.D., 814.73
 Ortiz, L., 737.15
 Ortiz, L.A., 732.33
 Ortiz, M.A., 37.2, 374.10
 Ortiz, P.A., 5206, 8311, 794.2, 907.12, 937.14
 Ortiz-Acevedo, A., 629.4
 Ortiz-Capistrano, M.C., 907.12
 Ortiz-Ortega, M.A., 828.10
 Ottmeyer, H.K., 8475, 964.3
 Ouda, H., 517.6
 Ouafo, D., 890.1
 Oumara, E.Y., 5258
 Ouhom, J.L., 479.12, 597.1, 598.20, 754.1, 961.6
 Ouhom, J.R., 862.7
 Ouhom, J.W., 5425, 899.3, 903.1, 955.10, 961.5
 Ouhom, T., 5448, 787.1
 Ouhom, T.F., 5326, 780.2
 Ousi-Hyiaman, D., 729.1
 O'Shea, K.M., 908.5, 908.6
 O'Shea, M., 41.15, 341.11
 Oshida, Y., 839.8
 Oshikawa, J., 737.24
 Oshika, H., 747.11
 Oskerkizian, C., 578, 625.3
 Oslakovic, C., 635.7
 Osumund, J.M., 755.8
 Ostl, G., 973.13
 Ostrovic, K., 710.11
 Ostrova, J.H., 501.3
 Oso, P.S., 536.1
 Ostankovich, M.I., 37.6, 545
 Otenloh, J.D., 226.5
 Othand, Jr., R.E., 542.8, 738.6
 Ostrem, R.S., 722.6, 724.4, 876.3
 Ostrov, D., 723.4
 Ostrov, D.A., 955.19
 Ostrov, D.J., 732.37
 Ostrowski, M.C., 374.7
 Ostrowski, R., 738.22
 Otsu, K., 737.24, 975.6
 Otsubo, T., 762.17
 Otuski, T., 551.10
 Ot, T.R., 720.1
 Ottaviano, F.G., 655.1
 Otto, A., 481.11
 Otto, H.H., 36.10
 Ota, H.-R., 696.8
 Ota, C.-Y., 517.4
 Ota, J., 373.3, 745.25
 Ota, Q., 893.11
 Ouellette, R.R., 779.1
 Ouellette, Y., 742.2
 Oughtred, R., 8334, 5024
 Oursouna-Benachour, K., 576.6
 Oury, T., 845, 708.13
 Oury, T.D., 732.33